

**ZUR BIOCHEMIE UND PHYSIOLOGIE
DER SEKRETORISCHEN TRYPSIN-INHIBITOREN
DES PANKREAS**

Max Hutzet

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für klinische Chemie und klinische Biochemie
der Universität München

Komm. Leiter: Priv. Doz. Dr. H. Fritz

ZUR BIOCHEMIE UND PHYSIOLOGIE
DER SEKRETORISCHEN TRYPSIN-INHIBITOREN
DES PANKREAS



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Max Hutzel

aus Aldersbach

München 1974



Berichterstatter:	P.D. Dr. H. Fritz
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	23.12.1974

Die vorliegende Arbeit wurde im Auftrag der ...
und ...

...
...

Meiner Familie

...
...

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Universität München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr.Dr. E. Werle danke ich für die wohlwollende Unterstützung meiner Arbeit.

Besonders Dank sagen möchte ich Herrn P.D. Dr. H. Fritz für die Überlassung des Themas, viele Diskussionen und wertvolle Anregungen.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	1
I Operationsmethodik und Versuchsmodelle	3
1. Hundepankreas	3
2. Kopfspeicheldrüsen des Hundes	6
II Sekretionsverhalten des Pankreas	6
1. Sekretin und Pankreocymin	6
Charakterisierung und Wirkungsweise	
2. Weitere Parameter zum Sekretionsgeschehen	9
III Gewinnung des Trypsin-Inhibitors aus Pankreas-	
sekret	11
1. Isolierung	16
2. Verarbeitung bis zu analytisch reinen Prä-	
paraten	20
3. Hemmtests	21
IV Eigenschaften der Inhibitoren	27
1. Trypsinspezifität	27
2. Temporäre Hemmung	32
3. Sekretionsverhalten	37
V Halbwertszeiten von Sekretin und Pankreocymin	40
1. Sekretin	40
2. Pankreocymin	43
Schluß und Zusammenfassung	46
Literatur zum Vorkommen der Proteinasen-Inhibitoren	
im Körper und dazugehöriges Schema	49
Literaturverzeichnis	51
Lebenslauf	55

Einleitung

Um die Jahrhundertwende beobachtete WEINLAND (1) zum ersten Mal die inhibitorische Aktivität von Schweineaskaris-Extrakten gegenüber Enzymen des Verdauungstraktes. Dieses "Antienzym", wie er es nannte, untersuchten MENDEL und BLOOD (2) genauer und fanden, daß es Trypsin und Pepsin in ihrer proteolytischen Wirkung hemmt.

Erst in den dreißiger Jahren wurde dieses Erkenntnis bei der weiteren Erforschung der Enzyme wieder aufgegriffen. 1936 berichteten KUNITZ und NORTHROP über die Isolierung und Kristallisation eines Trypsininhibitors aus Rinder-Pankreas (3), der hauptsächlich aus Aminosäuren aufgebaut sein sollte. Schon 1929 hatten WERLE und Mitarbeiter den sogenannten Kallikrein-Hemmstoff aus Rinderorganen entdeckt, der, wie sich später herausstellte, mit dem Inhibitor von KUNITZ identisch ist.

Das erste Trypsininhibitor-Präparat stellte COLLIER aus Pankreas (4) nach einer bereits von KUNITZ und NORTHROP für die Anreicherung des Inhibitors angegebenen Methode her. GREEN (5) gelang davon 1957 die Abtrennung einer Chymotrypsin-hemmenden Komponente; später isolierte PEANASKY (6) diesen Chymotrypsininhibitor in kristalliner Form. Auch in anderen Organen des Rindes, wie Parotis, Lunge, Milz, Leber, Samenblasen und Lymphknoten wurde ein Inhibitor entdeckt, der mit dem ursprünglich im Rinderpankreas gefundenen identisch ist (KRAUT, FREY u. WERLE 1936 (7); VOGEL u. Mitarb. 1966 - 68 (8); LAS-KOWSKY jr. u. SEALOCK 1971 (9)).

Heute ist dieser Inhibitor, ein aus 58 Aminosäuren aufgebautes basisches Polypeptid, als "basic pancreatic trypsin inhibitor (BPTI)" bekannt. Er ist gewebsständig und wird nicht sezerniert. Seine physiologische Funktion in den Rinderorganen ist bisher unbekannt. Sie muß sich auf die Zelle selbst

beziehen, weil der Inhibitor weder in Sekreten noch im Blut bzw. Plasma nachzuweisen ist. Da der Inhibitor erst nach der Geburt in den Geweben erscheint (10), dürfte eine Funktion im Bereich der biochemischen Grundmechanismen nicht in Frage kommen.

Einen weiteren Inhibitor, der mit den bisher erwähnten nicht identisch ist, fand KAZAL 1948 im Rinderpankreas (11). Auch GROSSMAN (12) wies im Pankreasgewebe des Hundes einen Inhibitor für Trypsin nach.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das eventuell allgemeine Vorkommen der Trypsininhibitoren in Speicheldrüsen, speziell im Pankreas, sowie deren biochemische Eigenschaften eingehend zu untersuchen. Außerdem sollte ihr Verhalten bei der Sekretion studiert werden, um Hinweise auf ihre physiologische Funktion zu erhalten. Dazu mußten verschiedene Parameter wie zum Beispiel das Erscheinen der Elektrolyte und des Kallikreins im Sekret herangezogen werden.

Das Hauptproblem bestand darin, Versuchsmodelle von Drüsen zu schaffen, die während der Experimente über viele Stunden exakte Ergebnisse lieferten. Die Stimulatoren mußten intraarteriell verabreicht werden, ohne die Perfusion der Drüsen in vivo zu beeinträchtigen. Das Sekret mit den zu untersuchenden Substanzen mußte quantitativ direkt aus dem Drüsengang gewonnen werden. Als Vorarbeiten waren umfangreiche anatomische, physiologische und auch experimentell chirurgische Untersuchungen notwendig.

I. Operationsmethodik und Versuchsmodelle

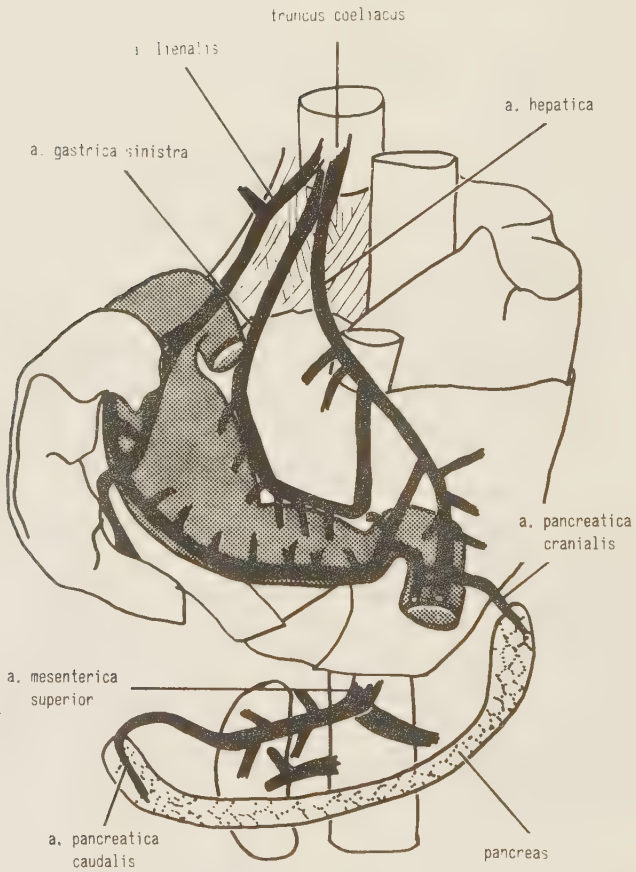
1. Hundepankreas

Die sekretionswirksamen Stoffe sollten ohne den üblichen oralen oder parenteralen Weg direkt in die Drüse eingebracht werden. Schema 1 zeigt die topographische Anatomie des Hundepankreas.

Das Pankreas des Hundes ist eine langgestreckte Drüse, einteilbar in zwei Abschnitte, die etwa in Höhe des Pylorus nach links und rechts sich erstrecken. Der linke Lappen (cauda pancreatis) verläuft ventral der Wirbelsäule bis in die dorsale Wand der bursa omentalis hinter den Magen. Der rechte Teil (caput pancreatis) zieht innerhalb des Mesenteriums des Duodenum vom Pylorus bis nahezu zu dem Punkt, wo das Duodenum nach links umbiegt. Das Pankreas besitzt manchmal zwei Gänge: den sehr kleinen ductus pancreaticus, der oft fehlt; er drainiert gewöhnlich den linken Lappen und geht entweder zusammen mit dem ductus choledochus oder für sich allein direkt in das Duodenum. Der ductus pancreaticus accessorius ist relativ groß und geht caudal vom Gallengang in das Duodenum.

Arteriell wird das Pankreas des Hundes wie folgt versorgt: der linke Lappen (caput) aus der A. hepatica - A. gastroduodenalis - A. pancreaticoduodenalis - A. pancreatica; der rechte Lappen (cauda) aus der A. mesenterica cranialis - A. intestinalis - A. pancreatica caudalis, die eine Anastomose mit der A. pancreaticoduodenalis eingeht, was sich für unsere beabsichtigten Versuche als geradezu ideal anbot.

Es wurden Hunde aller Rassen mit einem Mindestgewicht von 10 kg verwendet. Am besten geeignet für die Sekretionsversuche erwies sich eine oberflächliche Nembutalnarkose bei Spontanatmung. Andere Anästhetica, z.B. Äther oder Relaxantien, erwiesen sich durch ihre Wirkung auf die Speicheldrüsen als störend. Nach einem medianen, ca. 20 cm langen Bauchdeckenschnitt und



peinlichster Blutstillung wurde das Omentum majus unterhalb des Magens eröffnet, und zwar an einer Stelle, an der es wenige oder gar keine Netzgefäße gibt. Um den Abgang der arteria pancreatica genau zu markieren, orientiert man sich vom truncus coeliacus ausgehend cranialwärts an der arteria hepatica entlang bis zum Abgang der arteria pancreaticoduodenalis. Der das Pankreas versorgende Ast, die arteria pancreatica, wird dann freipräpariert und in möglichst großem Abstand von der Einmündung in die Drüse unterbunden. Es ist dann zu prüfen, ob die arterielle Versorgung des Pankreas von der anderen Seite her gut gewährleistet ist. Die arteria pancreatica wird mit einem Polyäthylen-Katheter von 2 mm Lumen kanüliert und so ein direkter arterieller Zugang zur Drüse geschaffen (13, 14).

Den ductus pancreaticus beim Hund zu finden ist schwierig, da sich das Pankreas vom Duodenum schlecht lösen läßt. Am besten luxiert man das Duodenum nach vorn und stellt den Punkt dar, an dem der Pankreaskopf das Duodenum zum ersten Mal berührt. Von dort aus läßt sich der ductus pancreaticus, der oft nur wenige Millimeter lang ist, durch vorsichtige stumpfe Präparation darstellen. Er wird angeschlungen, mit einer spitzen Gefäßschere eröffnet und kanüliert.

Um humorale und anderweitige Störfaktoren auszuschalten, wird der Pylorus mit einem breiten, nassen Band zugeschnürt. Der Magensaft wird durch eine Sonde nach außen abgeleitet.

Da auch keine Galle in das Duodenum fließen darf, sucht man den beim Hunde stets getrennt vom ductus pancreaticus mündenden ductus choledochus auf, unterbindet ihn und leitet die Galle durch einen weiteren Katheter nach außen.

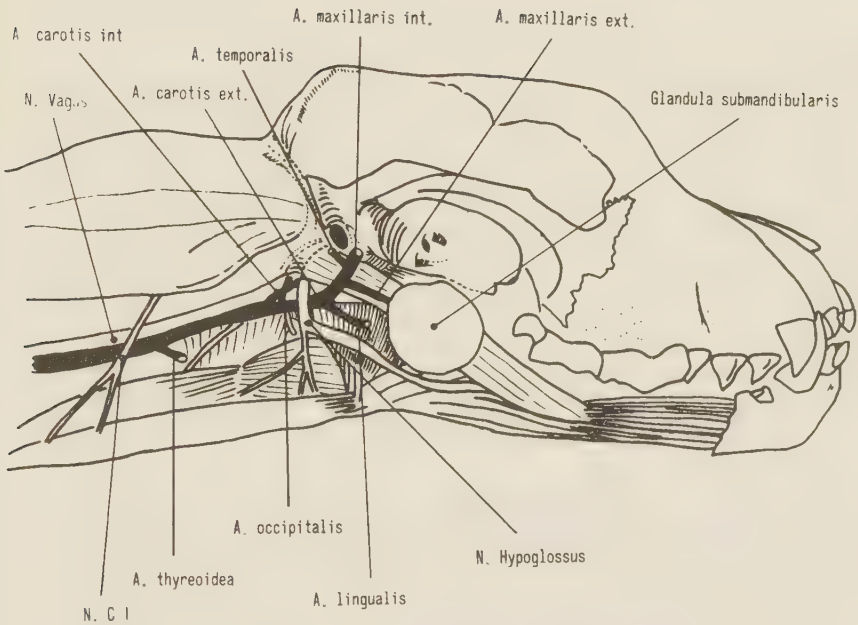
2. Kopfspeicheldrüsen des Hundes

Wie beim Pankreas war das Problem zu lösen, wie die zur Stimulierung der Sekretion benötigten Stoffe der Drüse intraarteriell appliziert werden könnten, ohne den versorgenden Blutstrom zu unterbrechen. Schema 2 zeigt die topographische Anatomie der Kopfspeicheldrüsen des Hundes.

Bei sorgfältiger Blutstillung wird der Hals durch einen medianen Hautschnitt so eröffnet, daß man durch die Halsmuskulatur in die Faszienloge der A. carotis communis gelangt. Von dort aus nach rostral präparierend stellt man alle Äste der großen Halsarterie dar: A. thyreoidea, A. carotis interna, A. lingualis, A. maxillaris. Bis auf die A. maxillaris werden alle Gefäße unterbunden. Die A. thyreoidea wird drüsen-nah unterbunden und mit einem konisch endenden Polyäthylenkatheter so kanüliert, daß die Spitze des Schlauches gerade in die A. carotis communis hineinreicht.

Am mandibularen Ende des Zungenfrenulums und in Höhe des zweiten Molaren werden die Ausführungsgänge der glandulae mandibularis und sublingualis bzw. parotis aufgesucht und ebenfalls mit Polyäthylenkathetern versehen (15).

Mit Hilfe dieser beiden Operationsmodelle war es möglich, Sekret zu gewinnen, dosisabhängige Wirkung und Latenzzeit verschiedener Pharmaka an den Speicheldrüsen zu studieren.



II. Sekretionsverhalten des Pankreas

1. Sekretin und Pankreocymin

Sekretin und Pankreocymin stimulieren vor allem das exokrine Pankreas, steigern jedoch auch in geringem Maße die Insulinsekretion. Sie sind Gewebshormone der Darmmukosa. Die Pan-

kreassekretion wird vorwiegend humoral gesteuert; dabei hat der Vagus regulatorische Wirkung, die leicht mit Atropin unterdrückt werden kann, ohne die Aktivität der beiden Hormone zu beeinträchtigen.

Sekretin ist ein Polypeptid aus 27 Aminosäuren, von denen 14 mit der Sequenz des Glukagons übereinstimmen. Das aus 33 Aminosäuren bestehende Proteohormon Pankreocymin hat am C-terminalen Ende die gleichen 5 Aminosäuren wie Gastrin. Wenn Säure aus dem Magen mit der Duodenalschleimhaut in Kontakt kommt, werden u.a. diese 2 Hormone freigesetzt. Sekretin allein lieferte einen wässrigen, sehr alkalischen und enzymarmen Pankreassaft; es stimuliert aber auch die Gallesekretion. Pankreocymin regt den Ausstoß der Zymogengranula aus den Acinuszellen an und bewirkt so die Sekretion eines enzymreichen Pankreassaftes. Wir haben Pankreassaft für unsere Zwecke auf folgende Weise gewonnen:

Hunde verschiedener Größe und Rasse werden, wie oben beschrieben, narkotisiert und über die vena femoralis mit Ringperlösung und 5 %iger Glukose per Dauertropfinfusion versorgt. Aus dem ductus pancreaticus wird das Sekret in ein eisgekühltes Gefäß geleitet. Alle 15 - 20 Minuten werden 2 ml eines 1 : 1-Sekretin-Pankreocymin-Gemisches i.v. appliziert. Man kann dieses Gemisch mit demselben Effekt auch mittels einer Infusionspumpe in einer Menge von 1 Einheit/kg/min. genau dosiert verabreichen. In der ersten Stunde ist das Sekret mukös und in der Menge gering, dann wird es dünnflüssiger und die Saftmenge beträgt z.B. bei einem 30 kg schweren Hund über Stunden konstant etwa 40 ml/h. In Abb. 1 ist die durch Stimulierung des Pankreas erzielte Inhibitorausschüttung in Abhängigkeit von der Sekretionsdauer graphisch dargestellt (13). Danach nimmt die Inhibitorausschüttung bis gegen Ende der ersten Stunde zu, bleibt dann während etwa drei Stunden konstant und sinkt schließlich rasch ab. Es lohnt sich deshalb nicht, Pankreassekret länger als 5 - 6 Stunden zu sammeln.

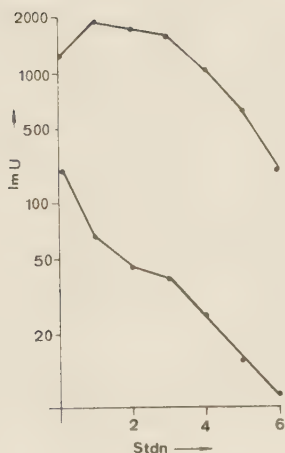


Abb. 1: Durch Stimulierung des Pankreas mit Sekretin-Pankreo-
cymin erzielte Inhibitorausschüttung im Pankreassekret
im Laufe einer sechsständigen Sammelperiode

2. Weitere Parameter zum Sekretionsgeschehen

Als weitere Parameter wurden Proenzyme wie Präkallikrein, Tryp-
sinogen und als Elektrolyt NaHCO_3 mitbestimmt (16, 17). Es
wurden abwechselnd jeweils 15 IE Sekretin und Pankreoeymin
(Fa. Boots Pure Drug Company Ltd., Nottingham, England) nach
dem in Abb. 2 gegebenen Zeitplan injiziert. Die Wirkung setzt
jeweils mit einer Verzögerung von 1 - 4 Minuten ein. Die Län-
ge des abführenden Schlauches bedingt außerdem eine zeitliche
Verschiebung bei der Gewinnung der für die beiden Hormone cha-
rakteristischen Saftarten. In den eisgekühlten Proben wurden
Präkallikrein, Trypsinogen, Natriumionen (flammenphotometrisch)
und Trypsininhibitor bestimmt.

Aus Abb. 2 geht hervor, daß die Sekretion von Präkallikrein,
Trypsinogen und Inhibitor streng parallel erfolgt: steigt die
Konzentration des Trypsinogens im Sekret z.B. um den Faktor 10,

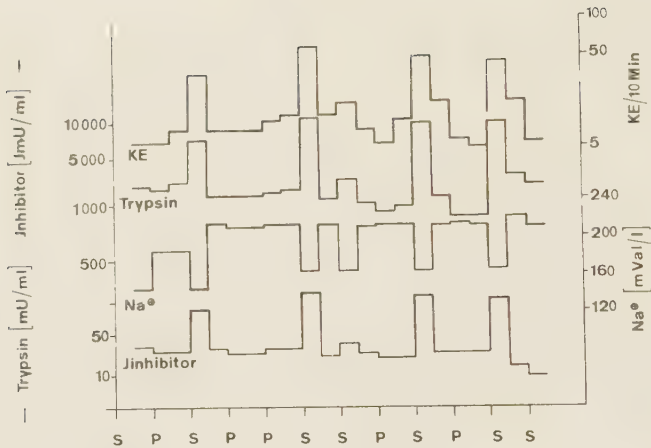


Abb. 2: Parallele Sekretion von Präkallikrein, Trypsinogen, NaHCO_3 und Trypsininhibitor beim Pankreas des Hundes nach i.v.-Injektion von Sekretin (S) und Pankreozymin (P). Linke Ordinate: mU Enzym (nach Aktivierung des Trypsinogens) bzw. ImU Inhibitor pro ml Sekret; rechte Ordinate: biologische Standardeinheiten von Kallikrein (getestet am Hundeblutdruck) und mval Na^+ -Ionen pro ml Sekret. Abszisse: Zu den durch die Pfeile markierten Zeitpunkten wurden 15 IE P bzw. S injiziert. Sammelperiode (Sekret) jeweils 20 Minuten.

so steigt die Inhibitorkonzentration ebenfalls etwa um das Zehnfache. Auch die Sekretion des Inhibitors und des Präkallikreins verhält sich gleichsinnig.

Die Extrusion der Zymogengranula - die neben anderen Proenzymen das Trypsinogen enthalten - wird durch Pankreozymin ausgelöst (18, 19). Die sekretinstimulierte Hydrogencarbonatausscheidung ist genau gegenläufig; wir haben das Natrium-Ion als Leit-Ion gewählt. Aus Abb. 2 geht weiter hervor, daß die untersuchten Stoffe nach Pankreozyminreiz aus dem Gangsystem des Pankreas völlig ausgewaschen werden. Der geschilderte Versuch wurde an 10 Hunden ausgeführt. Jedesmal wurden die glei-

chen Ergebnisse erzielt. Auch beim Menschen erzeugt die i.v.-Gabe von Pankreocym und Sekretin eine Ausschüttung von Trypsinogen und Inhibitor analog wie bei den genannten Tierversuchen. Die Pankreassekretion wurde mit 1 E/kg Pankreocym bzw. Sekretin stimuliert gemäß dem in Abb. 3 angegebenen Schema (17):

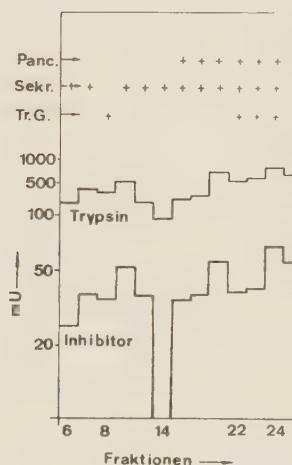
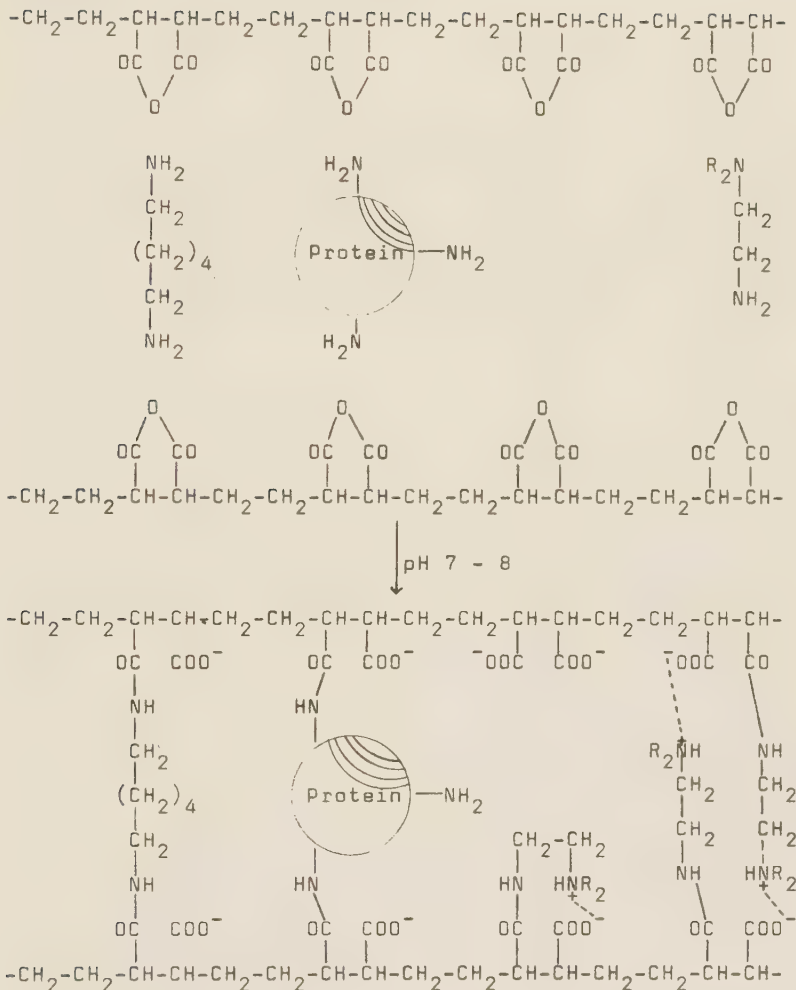


Abb. 3: Sekretion von Trypsinogen und spezifischem Trypsininhibitor beim Pankreas des Menschen. Ordinate: mU Trypsin bzw. mU Inhibitor/ml Sekret. Abszisse: Fraktionen entsprechend Sammelperioden von 10 - 20 min. Panc.= Pankreocym; Sekr.= Sekretin; Tr.G.= Trockengalle; Tryp.= Trypsinogen; Inh.= Inhibitor.

III. Gewinnung des Trypsin-Inhibitors aus Pankreassekret

Die Reindarstellung der sekretorischen Proteinase-Inhibitoren ist wegen ihrer geringen Konzentration in den Körperflüssigkeiten mit den üblichen Methoden der Protein-Isolierung zeitraubend und aufwendig. Wir versuchten, mit Hilfe von wasserunlöslichen Enzymharzen ein einfaches und spezifisches Ver-

fahren zur Isolierung von Proteinase-Inhibitoren auszuarbeiten. Wasserunlösliche Derivate von biologisch aktiven Proteinen wurden bisher vor allem zur Isolierung von Antikörpern und in Form von Enzym-Harzen als heterogene spezifische Katalysatoren bei der Hydrolyse von Substraten verwendet (20). Besonders vorteilhaft ist, daß diese Derivate von allen gelösten Substanzen leicht abzutrennen sind. Die große Schwierigkeit liegt jedoch darin, geeignete wasserunlösliche Trägerharze zu finden, an denen das fixierte Enzym seine biologische Aktivität weitgehend beibehält. Eines der aktivsten Derivate dieser Art ist das vom Arbeitskreis um LEVIN und KATCHALSKI (21) erstmals hergestellte Trypsinharz, in dem das Trypsin kovalent an den wasserunlöslichen Träger, ein Kopolymer aus Maleinsäure und Äthylen, gebunden ist. Die Herstellung des Enzymharzes ist dabei denkbar einfach: Man läßt nur die einzelnen Reaktionspartner, nämlich das betreffende Protein (z.B. Enzym), das im Handel erhältliche Kopolymer aus Maleinsäureanhydrid und Äthylen, sowie Hexamethyldiamin in wässriger Pufferlösung bei 0° C aufeinander einwirken (Abb. 4). Die ϵ -Aminogruppen von Lysylresten, die sich an der Oberfläche des Proteinmoleküls befinden, reagieren dabei mit den Maleinsäureanhydrid-Resten des Kopolymers. Außer Trypsin lassen sich auch Chymotrypsin und Kallikrein in unlösliche Enzymderivate überführen, die mindestens 20 % der eingesetzten biologischen Aktivität, bezogen auf die Hemmkapazität durch den Trypsin-Kallikrein-Inhibitor, besitzen. Aus Tabelle 1 ist zu ersehen, daß auch die höher vernetzten EMA-Harze, besonders vorteilhaft Typ 61, 71 und 81, zur Herstellung von Enzymharzen eingesetzt werden können.



Quervernetzung	Protein (Inhibitor bzw. Enzym)	Zwitterionenbildung
(Hexamethylen-diamin)	(über -Amino-Lys-Reste)	(Dimethyläthylendiamin)

Abb. 4: Herstellung der wasserunlöslichen neutralen oder N-Proteinharze, schematisch dargestellt

Tab. 1: Versuche zur Herstellung von Trypsin-EMA-Harz.

Ansätze: 20 mg EMA-Harz in 10 ml Puffer, 1 ml 0,1 %ige Hexamethyldiamin-Lösung, 50 mg Trypsin in 5 ml Puffer. Das jeweilige Trypsin-Harz wurde mit Puffer mehrmals gewaschen (Zentrifugation). Danach wurde das Trypsinharz zur Prüfung der Adsorptionskapazität in einer Trypsin-Kalikrein-Inhibitor-Lösung (pH 7,8) aufgeschlämmt und die Suspension eine halbe Stunde gerührt. Nach Aus-testen des Überstandes auf Inhibitorgehalt wurde das Trypsinharz wiederum mehr-mals mit Puffer (pH 7,8) gewaschen, in einer sauren Pufferlösung (pH2,0) auf-geschlämmt und eine halbe Stunde gerührt.

EMA-Harz Typ	nicht gebundenes Trypsin (Überstand) (mg)	Zugabe an* Inhibitor (pH 7,8)	nicht gebundener gebundener Inhibitor* Inhibitor (Überstand)	freigesetzter Inhibitor* (pH 2,0)
21 - 31	5	13	0**	9
61	9	29	2	26
71	21	22	5	17
81	8	29	3	25
91	30	14	6	8

* Angaben in mg gehemmten Trypsins.

** Die Adsorptionskapazität des Enzymharzes war bei diesem Versuch nicht erschöpft.

Unsere Modifikation der Methode:

Material

Cellulosepulver Nr. 123 (Schleicher & Schüll); Kopolymere aus Maleinsäureanhydrid und Äthylen (EMA - 21, 31, 61, 71, 81 und 91 der Fa. Monsanto, St. Louis/USA); α -Chymotrypsin, 3 mal krist. (Schuchardt, München); Hexamethyldiamin purum (Fluka); Kallikrein, 50 % rein, lyophilisiert (Farbenfabriken Bayer, Wuppertal-Elberfeld); Trypsin: Trypure novo (Novo Industrie, Mainz).

Herstellung der Protein-Harze

Trypsin- und α -Chymotrypsinharz: alle Operationen müssen bei 0 - 4° C vorgenommen werden.

200 mg Maleinsäureanhydrid-Äthylen-Kopolymer (EMA - 21 oder EMA - 31) werden in wenig 0,2 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5) unter Eiskühlung kurz homogenisiert, Die Suspension wird mit demselben Puffer auf 200 ml aufgefüllt, mit 20 ml einer 0,1 %igen, wässrigen Hexamethyldiaminlösung versetzt und 3 Min. gerührt. Danach wird 1 g Trypsin oder Chymotrypsin in 100 ml 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,5) gelöst, dazugegeben und die Mischung über Nacht ca. 12 Stunden im Kühlschrank stark gerührt, wobei das pH der Lösung durch evtl. Zusatz von Puffer auf 7,5 gehalten wird. Die Suspension wird nun mit etwa dem doppelten Volumen bidestilliertem Wasser verdünnt und so lange im Kühlschrank aufbewahrt (ca. 6 Stunden), bis sich alle Feststoffteilchen abgesetzt haben. Testet man die überstehende Lösung auf Enzymaktivität, so läßt sich die Menge des an das unlösliche Harz gebundenen Trypsins bzw. Chymotrypsins berechnen. Das unlösliche Enzymharz kann auch durch Zentrifugation isoliert werden (vgl. dazu auch Tab. 1).

Das Enzymharz wird, je nach gewünschter Tropfgeschwindigkeit der Säulen, mit dem 2-fachen Volumen von mehrmals aufgeschlämtem und dekantiertem Cellulosepulver gemischt und in eine Säule

le mit Kühlmantel gegossen (Kühlung auf $0 - 4^{\circ} \text{C}$ mit Hilfe des Ultra-Kryomat TK - 30 Lauda). Man wäscht die Säule mit $0,1 \text{ M}$ Triäthanolaminpuffer ($\text{pH } 7,8$), der außerdem $0,1 \text{ M}$ an NaCl und $0,01 \text{ M}$ an CaCl_2 enthält, bis kein aktives Trypsin (Substrat: N^{ω} -Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid) bzw. Chymotrypsin (Substrat: N^{ω} -3-Carboxypropionyl-L-phenylalanin-p-nitroanilid) im Eluat mehr nachzuweisen ist. Wird das Enzymharz längere Zeit nicht verwendet, so kann es in demselben Puffer ohne Aktivitätsverlust bei 0°C gelagert werden. Es empfiehlt sich, mit einigen Tropfen Chloroform durchzuschütteln, um auch einen guten antibakteriellen Effekt zu erreichen.

Kallikrein-Harz: 400 mg EMA - 21 wurden in 200 ml $0,2 \text{ M}$ Phosphatpuffer ($\text{pH } 7,5$) bei 0°C kurz homogenisiert. Die entstandene Mischung wurde gerührt. Danach wurden 200 mg des Kallikrein - Präparates, gelöst in 20 ml $0,2 \text{ M}$ Phosphatpuffer ($\text{pH } 7,5$) zugegeben und die Suspension über Nacht im Kühlschrank gerührt. Die Suspension wurde wie bei der Herstellung des Trypsin-Harzes verdünnt und das Kallikrein-Harz abzentrifugiert. Im Überstand waren nur noch $0,5 \%$ der eingesetzten Kallikreinaktivität nachzuweisen. Das Kallikrein-Harz wurde mit etwa dem vierfachen Volumen Cellulosepulver gemischt und in eine gekühlte, 1 cm hoch mit Sephadex G - 25 - gefüllte Säule gegossen und mit $0,1 \text{ M}$ Triäthanolamin-Puffer ($\text{pH } 7,8$), der zusätzlich $0,2 \text{ M}$ an NaCl war, gewaschen.

1. Isolierung der Proteinaseinhibitoren

Das Pankreassekret wird mit Enteiweißungsmitteln (z.B. Perchlorsäure 6% ig, Äthanol) von hochmolekularen Proteinen befreit, wobei besonders auf eine weitgehende Entfernung bzw. Zerstörung des Trypsinogens zu achten ist. Die enteiweißten Extrakte werden durch Pufferzugabe auf $\text{pH } 7,8$ eingestellt. Ihr Salzgehalt soll mindestens einer $0,2 \text{ M}$ NaCl -Lösung entsprechen. Bei Trypsinogenfreien Sekreten (z.B. Speicheldrüsen, Samenblasen, Samenflüssigkeit und Speichel) ist keine Entei-

weißung erforderlich. Hier wird mit 0,2 M Puffer (pH 7,8) so stark verdünnt, daß die Viskosität der Lösungen die Tropfgeschwindigkeit der Säulen nicht zu sehr vermindert.

Trypsininhibitoren: Die inhibitorhaltige Lösung wird bei pH 7,8 direkt auf die Enzym-Harz-Säule aufgegeben. Eine aus 1 g Trypsin hergestellte Enzym-Harz-Säule adsorbiert eine Inhibitormenge, die der Hemmung von ca. 200 mg Trypsin in Lösung entspricht. Die Tropfgeschwindigkeit der Säulen soll nicht zu hoch sein (20 - 30 Tropfen pro Min. bei einer 3 x 10-cm-Säule). Sobald überschüssiger Inhibitor in nennenswerter Konzentration im Eluat erscheint, wird die Säule mit 0,1 M Triäthanolaminpuffer (plus 0,1 M NaCl) (pH 7,8) völlig eiweißfrei gewaschen.

Die Ablösung des Inhibitors vom Enzym-Harz und damit seine Elution aus der Säule erfolgt mit 0,2 - 0,3 M KCl/HCl-Puffer (pH 1,4 - 1,6). Es kann auch ein 0,2 M Glycin/HCl-Puffer dazu verwendet werden.

Nachdem der Inhibitor aus der Enzym-Harz-Säule ausgewaschen ist, wird diese mit 0,1 M Triäthanolaminpuffer (+ 0,1 M NaCl) (pH 7,8) wieder ins Gleichgewicht gebracht. Sie kann dann sofort mit neuer Inhibitorlösung beladen werden. Wir haben dieselbe Trypsin-Harz-Säule bereits mehr als hundert Mal den beschriebenen Verfahrensschritten unterworfen, ohne daß ihre Adsorptionskapazität für Inhibitoren merklich nachgelassen hätte.

Das den Inhibitor enthaltende Eluat wird nach Zurückstellung des pH-Wertes der Lösung auf 5 - 6 im Rotationsverdampfer im Vakuum bei einer Badtemperatur von 30° C stark eingeeengt, die ausfallenden Salze werden abzentrifugiert und mit wenig Wasser gewaschen. Die konzentrierte Inhibitorlösung wird über eine Sephadex - G 25 - Säule entsalzt.

Die so erhaltenen Inhibitoren waren in allen Fällen völlig frei von Begleitsubstanzen und trennten sich bei der Elektrophorese nur noch in Zonen auf, die Inhibitorwirkung aufwiesen sowie einheitliche Aminosäureendgruppen besaßen. Bei guter Kühlung der Säulen liegt die Ausbeute an Inhibitor, bezogen auf den Gehalt im Ausgangsextrakt, zwischen 85 und 100 % (Tab. 2)

Tab. 2: Ausbeuten an Trypsininhibitoren bei verschiedenen Ausgangsmaterialien.

Trypsininhibitoren isoliert aus	Ausbeute %
Menschlichem Pankreassekret	95
Schweinepankreas	90 - 95
Hundepankreas	90
Rinderpankreas	90 - 95
Mäusesamenblase	75 - 85

Zur Isolierung von Inhibitoren aus Sekreten verwendet man also die Enzym-Harze, gemischt mit Cellulosepulver zur Erhöhung der Tropfgeschwindigkeit, am besten in Säulen, die auf $0 - 4^{\circ} \text{C}$ gekühlt werden. Die aufzugebenden Sekrete dürfen, sofern die Säulen nur mit Wasser gekühlt werden ($8 - 10^{\circ} \text{C}$), keine Enzyme enthalten, die das an das Harz gebundene Enzym zerstören können. Pankreassekrete wurden deshalb vorher vom Trypsinogen befreit. Trypsinogen würde durch das fixierte Trypsin aktiviert werden, Durch autokatalytische Zerstörung des Trypsins, die bekannt ist, würde auch das an das Harz fixierte Trypsin abgebaut und das inhibitorspezifische Adsorptionsvermögen der Säulen somit zerstört werden. Da das Enzym-Harz sehr viele freie Carboxylgruppen besitzt, also als Ionenaustauscher wirksam ist, muß sowohl der inhibitorhaltige Extrakt als auch die Waschlösung auf eine genügend hohe Salzkonzentration eingestellt werden. Bei den von uns verwendeten mindestens $0,2 \text{ M}$ Salz-Pufferlösungen trat keine unspezifische Proteinadsorption mehr auf.

Die Abdissoziation des Inhibitors vom fixierten Trypsin und seine Elution aus der Säule erfolgt bei Trypsininhibitoren mit sauren Salzlösungen vom pH $1,4 - 1,6$, bei Chymotrypsininhibitoren mit solchen vom pH $2 - 2,3$ und bei Kallikreininhibitoren

mit solchen vom pH 2 - 3. Je saurer die Elutionslösung ist, desto konzentrierter wird der Inhibitor im Eluat erhalten. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß der Inhibitor auch mit neutralen Harnstofflösungen vom fixierten Enzym abgelöst werden kann. Die vorübergehende reversible Denaturierung von Enzym und Inhibitor reicht hier bereits aus, um den Trypsin-Inhibitor-Komplex zur Dissoziation zu bringen. Dieser Befund ist von Bedeutung für die Isolierung säureinstabiler höhermolekularer Inhibitoren mit Hilfe von Enzym-Harzen.

Neben der Einfachheit und raschen Durchführbarkeit des Verfahrens sind die hohen Ausbeuten bei der Isolierung von Proteaseinhibitoren über die Enzym-Harze bemerkenswert: sie liegen durchweg zwischen 85 und 95 %, bezogen auf den Inhibitorgehalt der Ausgangsextrakte, und damit weit über den Ausbeuten, die man bei Aufarbeitung der Extrakte mit den üblichen Methoden der Proteinisolierung erhält. Wichtig ist eine gute Kühlung der Trypsin-Harz-Säulen bei der Isolierung der Trypsin-Inhibitoren aus Pankreassekreten, da diese auch vom Trypsin abgebaut werden können. Die Substrat-spaltende Aktivität der Enzyme kommt bei 0 - 4° C praktisch zum Erliegen, während die Komplexbildung mit den Inhibitoren noch unmeßbar rasch eintritt.

Der entscheidende Vorteil der Enzym-Harze ist ihre praktisch unbegrenzte Verwendbarkeit für dieselben Isolierungsschritte. Die Stabilität der an das Harz fixierten Enzyme wird sicherlich durch die tiefe Temperatur (0 - 4° C) und den Ca^{2+} -Gehalt der Pufferlösungen (beim Trypsin und Chymotrypsin) erhöht. Dazu kommt, daß eine Selbstverdauung des Trypsins durch seine Fixierung ausgeschlossen ist. Aber auch die Carboxylgruppen des Harzes dürften wesentlich zur Stabilisierung der Enzyme beitragen: z.B. wird Kallikrein in Lösungen vom pH 2 innerhalb kurzer Zeit irreversibel inaktiviert, das an das Harz fixierte Kallikrein kann jedoch bei 4 - 8° C längere Zeit ohne merklichen Aktivitätsverlust Lösungen von pH 2 - 3 ausgesetzt werden.

Auch die Trennung von Inhibitorgemischen, wie sie z.B. im Rinderpankreas vorliegen, ist bei Anwendung dieses Verfahrens denkbar einfach. Man läßt die Extrakte nacheinander durch die entsprechenden Enzym-Harz-Säulen laufen und erreicht so eine quantitative Trennung der Inhibitoren in einem Arbeitsgang. Wir haben in Umkehrung des beschriebenen Verfahrens auch Inhibitoren in unlösliche Inhibitor-Harze übergeführt und mit deren Hilfe die entsprechenden Enzyme isoliert. Wir glauben, damit ein auch in technischer Hinsicht interessantes Verfahren zur Isolierung von Inhibitoren und Enzymen entwickelt zu haben, das bei geeigneter Modifizierung auch zur Isolierung hochmolekularer, biologisch aktiver Proteine eingesetzt werden kann.

2. Verarbeitung bis zu analytisch reinen Präparaten

Elektrophorese

a. präparativ:

Vertikale Hochspannungselektrophorese nach Grassmann und Hannig: Trägerpapier Nr. 230 (Fa. Binzer); 5 mM Veronal-Natrium-Puffer, pH 7,8; Bedingungen: 2300 Volt, 4 - 8 Stunden. Die anfallenden Proben wurden quantitativ auf ihren Inhibitorgehalt getestet.

b. analytisch:

Träger: Celluloseacetatfolien (275 x 310 mm) der Fa. Schleicher und Schüll; 0,01 M Boratpuffer vom pH 8,0; 400 Volt, 3 Stunden Laufzeit in Elphor-Kammern der Fa. Bender & Hobein, München, Außerdem verwendeten wir Chromatographiepapier (Whatman Nr. 1, 39 x 285 mm). Puffer: 0,01 M Boratpuffer, pH 7 - 8; 200 - 400 Volt; 1 - 3 Stunden Laufzeit. Die Inhibitorpräparate aus Pankreas von Schwein, Hund und Rind trennten sich bei der Elektrophorese auf Celluloseacetatstreifen jeweils in drei inhibitorisch aktive Zonen auf, wie in Abb. 5 schematisch dargestellt ist.

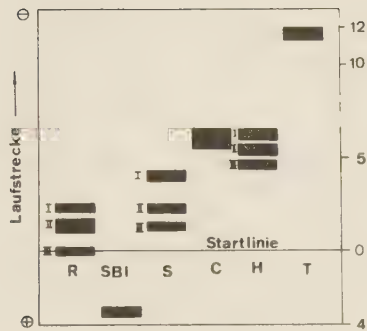


Abb. 5: Elektrophoretisches Verhalten der Inhibitoren aus Pankreas von Hund (H), Schwein (S) und Rind (R). Zum Vergleich: Inhibitor aus Sojabohnen (SBI), α -Chymotrypsin (C) und Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (T) aus Rinderorganen.
Bedingungen: 0,01 M Boratpuffer (pH 7,0), Celluloseacetatfolien für präparative Elektrophorese, 200 V, 2,5 Std.
Ordinate: Laufstrecke in cm.

Die Abb. 5 a zeigt die Verteilung der Inhibitoraktivität auf die jeweiligen Zonen beim Schweinepankreas-Inhibitor.

3. Hemmtests

Inhibitoren, die in relativ hoher Konzentration vorkommen, sind auch mit unempfindlicheren Methoden nachweisbar, so z.B. die Trypsininhibitoren in Serum, Samenblasen und Submandibularisdrüsen.

Für die exakte Bestimmung von niedrigen Hemmstoffkonzentrationen in Sekreten mit hohem Gehalt an aktivierbaren Proenzymen, aktiven Proteasen, anderen Eiweißstoffen und Nukleinsäuren sind die üblichen Proteinasesubstrate wie Casein oder Hämoglobin sowie synthetische Ester und Amide von Acetylaminosäuren jedoch ungeeignet, da sie entweder zu unspezifisch sind

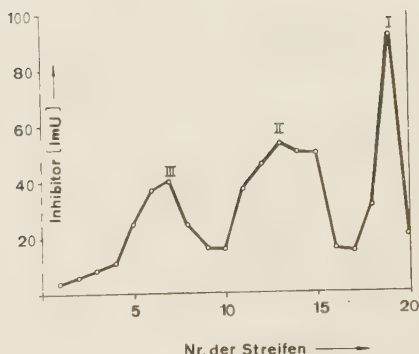


Abb. 5a: Elektrophorese des Inhibitors aus Schweinepankreas auf Celluloseacetatfolien.
Aufgetragene Inhibitormenge: 0,5 mg Protein; 0,01 M Boratpuffer (pH 8,0); Wasserkühlung (Elphor-Kammern); 3 Std. bei 400 V. Die Folie wurde nach dem Trocknen in 2 mm breite Streifen quer zur Laufrichtung geschnitten und jeder Streifen mit 0,5 ml 0,1 M NaCl-Lösung eluiert. Der Inhibitorgehalt der einzelnen Proben (Streifen) wird in ImU angegeben (Ordinate). In der Abbildung sind nur die Inhibitoraktivität enthaltenden Folienstreifen (Abszisse) angegeben.

oder zu langsam hydrolysiert werden. So kommen z.B. im Pankreassekret von Mensch und Tier auf 1 Inhibitormolekül bis zu 100 leicht aktivierbare Trypsinmoleküle; außerdem ist die Konzentration dieses Trypsininhibitors manchmal sehr gering: bei 1 mg Trypsinogen pro Milliliter Sekret beträgt die Inhibitor-konzentration ca. 10 ImU, das sind 2,5 Mikrogramm Inhibitor pro Milliliter (17). Für den exakten Nachweis einer geringen Inhibitormenge müssen an den entsprechenden Enzymtest folgende Anforderungen gestellt werden (22):

- a. Während der Inkubation des Trypsins mit der inhibitorhaltigen Testlösung und nach Zugabe des Substrates auch während der Messung darf es zu keiner Aktivierung des im Überschuß vorhandenen Trypsinogens und zu keinem proteolytischen Ab-

bau des Inhibitors kommen.

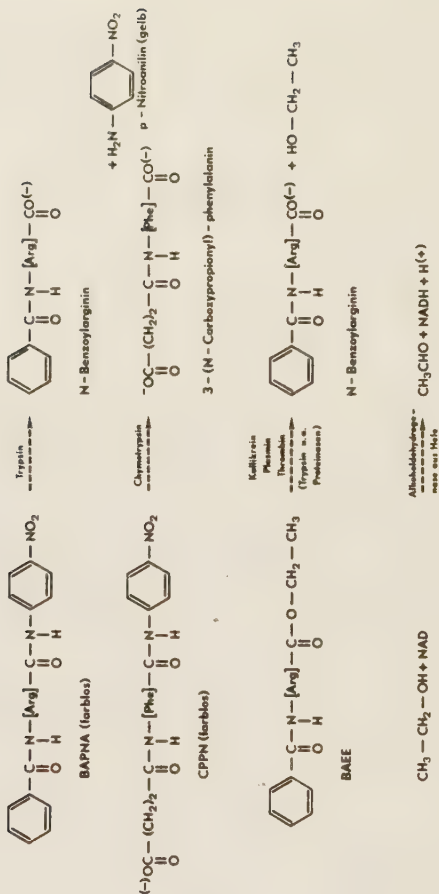
- b. Mikrogramm-Mengen des Enzyms müssen in Gegenwart von viel Fremdeiweiß und Nukleinsäuren reproduzierbar erfaßt werden; d.h.: die übliche direkte Verfolgung der Spaltung von Acetyl-aminosäureestern bei direktem optischen Test unter 350 nm ist nicht möglich.
- c. Das verwendete Substrat muß möglichst spezifisch für das betreffende Enzym sein.

Eine nahezu ideale Kombination, die diese Anforderungen erfüllt, ist das System Trypsin/N-Benzoyl-arginin-p-nitroanilid (BAPNA) (23, 24, 25, 26, 27, 28) (siehe Abb. 6).

Hier kann die Spaltung des Substrates durch die Zunahme der Extinktion bei 405 nm (Eppendorf Filter-Photometer) direkt verfolgt werden. Somit sind Aktivierungs- und Inaktivierungsvorgänge im Ansatz sofort zu erkennen. Bis zu 1 Mikrogramm Trypsin lassen sich im Meßzeitraum von 5 Minuten exakt bestimmen und zwar unabhängig vom Protein- und Nukleinsäuren-Gehalt der Probe. Die Verminderung der Extinktionsänderung und damit des Substratumsatzes gegenüber einem Trypsinvergleichstest dient dabei als Maß für den Inhibitorgehalt der Probe. Die erwähnte Bestimmungsmethode ermöglicht uns den Nachweis, daß Sekrete der Bauchspeicheldrüsen von Mensch, Schwein, Hund und Katze (29) nur einen Inhibitor für Trypsin (= spezifischer Trypsininhibitor) in einer hinsichtlich der Enzymausstattung des Pankreas noch sinnvollen Konzentration enthalten.

Zur Bestimmung der Aktivität und Hemmung von Chymotrypsin verwendeten wir das Substrat N-(3-Carboxypropionyl)-L-phenylalanin-p-nitroanilid (CPPN), mit dessen Hilfe ähnlich geringe Inhibitorkonzentrationen wie beim Trypsintest spezifisch erfassbar sind (siehe Abb. 6).

Der exakte Nachweis von geringen Hemmstoffmengen für Kallikrein in Körperflüssigkeiten ist dagegen vorerst nur über die Bestimmung des bei der Spaltung von N^w-Benzoyl-arginin-äthylester (BAEE) frei werdenden Äthanol mit Alkoholdehydrogenase möglich (siehe Abb. 6) (30).



Da verschiedene Faktoren (zu hohe Salz-, Protein- und Nukleinsäurekonzentration sowie ungenügende Substratspezifität) diesen kombinierten Test störend beeinflussen, müssen die damit erzielten Resultate mit spezifischen Methoden überprüft werden. Dies geschieht bei den Kallikreinen am besten über ihre blutdrucksenkende Wirkung beim Hund.

Wir narkotisierten die Hunde mit Nembutal und beatmeten sie mit Hilfe einer Starling-Pumpe mit Zimmerluft. Dann wurde die A. carotis am Hals sorgfältig freipräpariert und der Blutdruck über ein Stathham-Element-Schreiber-System exakt registriert. Um genau dosierte Injektionen von Präparaten intravenös verabreichen zu können, legten wir in der Leistenbeuge die V. saphena magna frei; sie wurde mit einem Dauerkatheter mit Spritzenkonus versehen. Zu den Kallikreinauswertungen verwendeten wir Kallikreinstandard-Präparate der Fa. Bayer, Wuppertal-Elberfeld.

Für die photometrischen Bestimmungen gelten folgende Berechnungen (siehe dazu Tabelle 3):

Für Trypsin: 1 Enzym-Millieinheit (1 EmU) entspricht einer Extinktionsänderung ΔE von 0,00332/Min. (in 3 ml Ansatz in der Glasküvette, 1 cm Schichtdicke)

Für Chymotrypsin: wie bei Trypsin

Für Kallikrein: 0,01 EmU entspricht einer Extinktionsänderung ΔE von 0,0011 (beim kombinierten BAEE-ADH-Test)

Quantitative Auswertung nach Trautschold (27)

1 Enzymeinheit setzt nach Definition (31) 1 μM Substrat pro Minute unter Standardbedingungen (25°C) um und entspricht damit bei Verwendung des Substrates N^{α} -Benzoyl-arginin-p-nitroanilid (molarer Extinktionskoeffizient für p-Nitroanilin: $9,95 \times 10^3 [\text{l} \times \text{Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$) einer Extinktionsänderung von ΔE 9,95 pro Minute und pro ml. Für unsere Ansätze folgt daraus 10^{-3} Enzymeinheiten (EU) = 1 Enzymmillieinheit (EmU) entsprechen einer Extinktionsänderung von 0,00332/Min im 3 ml-Ansatz. 1 μg Trypsin (Trypure novo) bewirkt ein ΔE von 0,0030 bis

Tab. 3: Meßgröße zur quantitativen Bestimmung der Enzymhemmung, basierend auf der Definition einer internationalen Inhibitoreinheit nach Trautsohd. Aus meßtechnischen Gründen erfolgt die Angabe in Enzym- bzw. Inhibitor-Millieinheiten (EmU bzw. ImU).

Enzym	Substrat	E/Min. je 3 ml, die 1 EmU bzw. 1 ImU entspricht	ug Enzym, die 1 EmU spricht, bzw. durch 1 ImU gehemmt werden	Meßbereich im Ansatz in EmU
Trypsin	N ^ω -Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid	E= 0,00332 405 nm	1	1 - 40
Chymotrypsin	N- 3-carboxy-propionyl-L-phenylalanin-p-nitroanilid	E= 0,0032 405 nm	20	0,25 - 1,5
Kallikrein	N ^ω -Benzoyl-arginin-äthylester	E= 0,000383 253 nm	0,01	5 - 25
Kallikrein	N ^ω -Benzoyl-arginin-äthylester mit Alkoholdehydrogenase	E= 0,0011 366 nm	0,01	5 - 25

0,0035, entspricht also etwa einer EmU.

1 Inhibitoreinheit hemmt die Aktivität von 2 Enzymeinheiten zu 50 %, reduziert somit den Substratansatz um $1 \mu\text{M}/\text{Min.}$ Für unsere Ansätze folgt daraus: 10^{-3} Inhibitoreinheiten (IU) = 1 Inhibitormillieinheit (ImU) bewirken eine Verminderung der Extinktionsänderung ΔE um 0,00332/Min. im 3 ml-Ansatz.

Zur quantitativen Bestimmung der Kallikreinaktivität in den Testansätzen wurde das bei der Spaltung von N^{ϵ} -Benzoyl-L-arginin-äthylester entstandene Äthanol mit Hilfe der Alkoholdehydrogenase gemessen (32).

Die direkte Bestimmung der Kallikreinaktivität mit diesem Substrat täuschte infolge der hohen Eigenabsorption der Extraktproben bei 253 nm meist eine Hemmung der Kallikreinaktivität vor, die beim physiologischen Blutdrucktest am Hund nicht bestätigt werden konnte.

IV. Eigenschaften der Inhibitoren

1. Trypsinspezifität

Die sekretorischen Trypsin-Inhibitoren des Pankreas, in der angelsächsischen Literatur zu finden unter der Bezeichnung "pancreatic secretory trypsin inhibitors" (PSTI), die in den Bauchspeicheldrüsen aller bislang untersuchten Säugetiere vorkommen, wurden inzwischen aus Pankreas vom Rind, Schaf, Hund, Katze und Mensch rein dargestellt.

Zum Teil lassen sich von denselben Spezies in ihrer Hemmwirkung identische Inhibitoren gewinnen, die sich nur geringfügig in der Bausteinzusammensetzung unterscheiden.

Die Molekulargewichte der isolierten sekretorischen Trypsin-inhibitoren liegen bei 6000, ihre isoelektrischen Punkte zwischen 4 und 8,5. Die im allgemeinen aus 56 Aminosäuren (siehe Tabelle 4) aufgebauten Inhibitormoleküle werden, analog wie beim BPTI, durch je 3 Disulfidbrücken stabilisiert, wie die Abbildung 7 zeigt.

Tab. 4: Aminosäurezusammensetzungen sekretorischer Trypsin-inhibitoren (und des BPTI)

Aminosäure	Anzahl der Aminosäuren pro Inhibitormolekül					
	Mensch ^a	Schwein ^b		Rind ^c (Schaf ^e)	Hund ^d	Katze ^d BPTI
		I	II			
Asp	8	4	4	7	7	6 5
Thr	4	6	5	4	3	3 3
Ser	3	6	5	2(1)	4	4 1
Glu	6	7	6	7	6	6 3
Pro	3	5	4	4	3	4 4
Gly	5	4	4	5	4	4 6
Ala	1	1	1	1(2)	2	2 6
Val	2	4	4	4	3	3 1
Cys 1/2	6	6	6	6	6	6 6
Met	-	-	-	1	-	- 1
Ile	3	3	3	3	4	3 2
Leu	4	2	2	4	5	5 2
Tyr	3	2	2	2	2	2 4
Phe	1	-	-	-	-	- 4
Lys	4	4	4	3	5	6 4
Arg	3	2	2	3	2	2 6
Summe	56	56	52	56	56	56 58

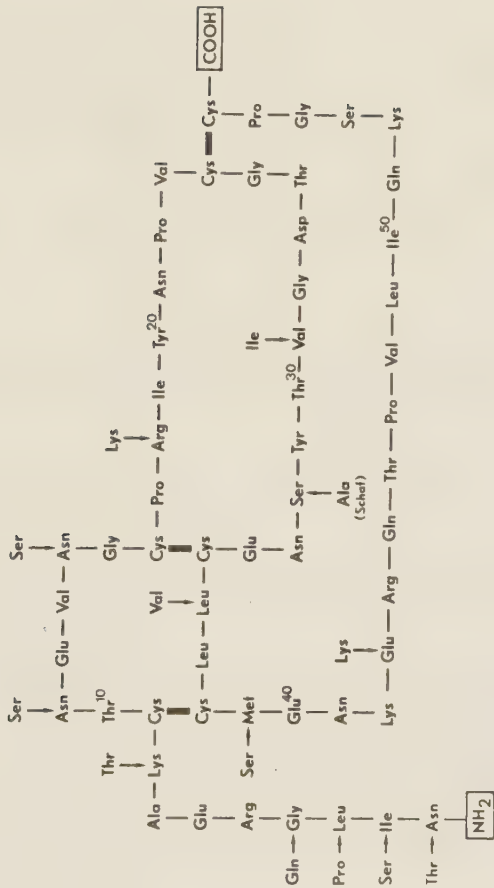
^a L.J. Greene; M.H. Pubols

^b L.J. Greene; H. Tschesche; H. Fritz u. Mitarbeiter

^c L.J. Greene; E.W. Cerwinsky; P.J. Burck; H. Fritz u. Mitarb.

^d H. Tschesche u. Mitarb.

^e H. Fritz, K. Hochstraßer u. Mitarb.



Folgende Eigenschaften zeichnen die sekretorischen Trypsin-inhibitoren aus:

1. sie sind Trypsin spezifisch, d.h.: sie hemmen von allen bekannten Proteinasen des Pankreas nur das Trypsin, das sowohl sich selbst als auch alle anderen Proenzyme der Bauchspeicheldrüse zu aktivieren vermag. Auch die Spezies-Spezifität ist z.T. sehr ausgeprägt: menschliches Trypsin wird z.B., soweit es von uns untersucht wurde, nur von menschlichem sekretorischem Trypsininhibitor gehemmt, während der sezernierte menschliche Pankreasinhibitor (englisch: PSTI = pancreatic secretory trypsin inhibitor) nach GREEN (33) auch noch die Trypsine von Rind und Schwein hemmt.

Für alle Untersuchungen wurden über Trypsinharz gereinigte Inhibitorpräparate mit einer spezifischen Aktivität von 3 - 3,5 ImU/ μ g Protein verwendet.

Abbildung 8 zeigt, daß das Hemmverhalten der Inhibitoren aus Schweine- (a) und Hundepankreas (c) sowie aus menschlichem Pankreassekret (d) in Gegenwart des synthetischen Substrates N--Benzoyl-arginin-p-nitroanilid kompetitiv ist, beim Inhibitor aus Rinderpankreas (b) dagegen nichtkompetitiv.

Die Hemmung des Trypsins ist optimal von pH 5,5 - 11,0, bezogen auf die jeweilige Trypsinaktivität, wie am Beispiel des Inhibitors aus Schweinepankreas gezeigt sei:

pH	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	9,5	10,0	10,5	11,0
	43	38	50	47	47	48	46	44	48	48	44	50
% Hemmung												

Abhängigkeit des Hemmgrades von der Inkubationszeit: der sofort (5 - 10 Sek.) nach Zugabe des Inhibitors zur Trypsinlösung vom pH 7,8 meßbare Hemmgrad ändert sich mit zunehmender Inkubationszeit (bis zu 15 Min.) bei einer Inkubationstemperatur von 20 - 25° C nicht mehr. Dies gilt auch dann, wenn zuerst das Substrat und dann erst der Inhibitor zur Trypsin-

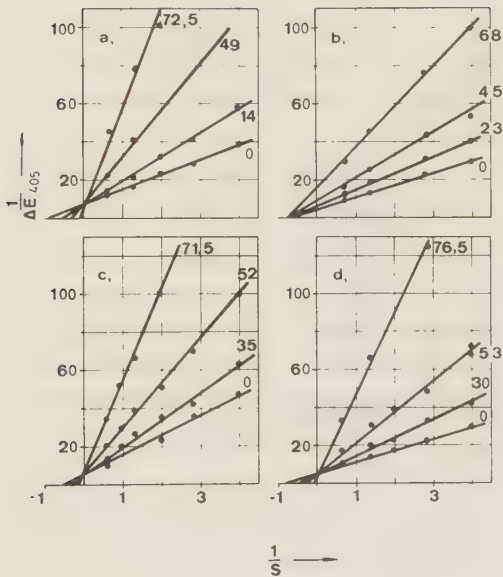


Abb. 8: Hemmverhalten nach LINEWEAVER und BURK der Inhibitoren aus Pankreas von Schwein (a), Rind (b), Hund (c) und Mensch (d).

Ansätze: zu 5 mU (ca. 5 μ g) Trypsin wurden steigende Mengen (0,25 - 1,5 mg) N -Benzoyl-DL-arginin-p-nitro-anilid, in Wasser gelöst, plus 0,2 M Triäthanolamin-puffer (pH 7,8) ad 3 ml Endvolumen gegeben. Die Zahlen an den Kurven geben den jeweiligen Hemmgrad in % bei entsprechenden Inhibitorkonzentrationen an, wobei die Hemmgrade auf den 1,5 mg Substrat enthaltenen Ansatz bezogen wurden.

Ordinate: $1/\Delta E_{405}$ pro 5 Min.; Abszisse: $1/S$ (S = Substratkonzentration in mg pro 3 ml Endvolumen). Temperatur 25° C. (16).

lösung gegeben wird. Geht man von gleichen Mengen Trypsin und Inhibitor aus, so ist in beiden Fällen auch der Hemmgrad gleich hoch. Die Hemmkurven sind in Abbildung 9 dargestellt (16).

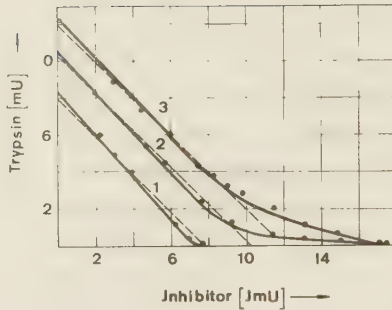


Abb. 9: Hemmkurven der Inhibitoren aus Pankreas von Schwein (1), Hund (3), Rind (2) und Mensch (1). Die gestrichelten Linien entsprechen den theoretischen Werten.

Ansätze: 1 mg N -Benzoyl-arginin-p-nitroanilid in 1 ml Wasser, 10 mU (ca. 10 μ g) Trypsin, Inhibitorlösung 0,01 bis 0,2 ml) und 0,2 M Triäthanolaminpuffer (pH 7,8) in 3 ml Endvolumen. Messung bei 405 nm (Eppendorf-Photometer). Temperatur 25° C.

Hier fällt die lineare Zunahme des Hemmgrades bis zum 100 %-Wert bei den Inhibitoren aus Schweinepankreas und menschlichem Pankreassekret auf, während die Inhibitoren aus Hunde- und Rinderpankreas erst im Überschuß das vorgelegte Trypsin vollständig hemmen.

2. Temporäre Hemmung

Die sekretorischen Trypsininhibitoren hemmen im Gegensatz zum BPTI und vielen pflanzlichen Proteinaseinhibitoren temporär, also nur auf Zeit. Nach der sehr rasch - innerhalb von wenigen Sekunden - verlaufenden Komplexbildung wird der Inhibitor relativ langsam, d.h.: im Verlaufe mehrerer Stunden enzymatisch durch die Spaltung einer Peptidbindung modifiziert zu I' und anschließend zu inaktiven Bruchstücken abgebaut, nach dem Schema: $E + I \rightleftharpoons EI \rightleftharpoons EI' \rightarrow E + \text{inaktive Polypeptide}$.

Sind Trypsin und weitere Proteasen wie im Duodenum im Überschuß vorhanden, so erfolgt die Inaktivierung des Inhibitors durch zusätzliche enzymatische Spaltungen des im Komplex gebundenen Inhibitors wesentlich rascher. Die Freisetzung der Trypsinaktivität verläuft parallel zur Inaktivierung des Inhibitors. Liegt also in der Inkubationslösung der Inhibitor gegenüber dem Trypsin auch nur in geringem Überschuß vor, so wird der Inhibitor nur äußerst langsam abgebaut. Ist dagegen das Trypsin im Überschuß, so wird der Inhibitor in Abhängigkeit vom Hemmgrad mehr oder weniger rasch zerstört.

Aus Abbildung 10 ist die interessanteste Eigenschaft der spezifischen Trypsininhibitoren zu ersehen, die temporäre Hemmung. Das am Beispiel des spezifischen Trypsininhibitors aus Schweinepankreas gezeigte Verhalten gegenüber Trypsin gilt in gleicher Weise auch für die Inhibitoren aus Hunde-, Rinder- und Menschenpankreas.

Das Phänomen der temporären Hemmung wurde in den frühen 50er Jahren entdeckt (34). Damals verwendete LASKOWSKI sekretorischen Pankreasinhibitor, ein Geschenk von Dr. KAZAL (35). Als er dieses Präparat mit Trypsin versetzte, verschwand zuerst die tryptische Aktivität, um aber dann - stetig stärker werdend - wiederzukommen. Parallel zum Wiedererscheinen der Trypsinaktivität konnte er ein Schwinden der Inhibitoraktivität feststellen. Ein Jahr zuvor hatten dies GORINI und AUDRAIN (36, 37) beim Versetzen von Rindertrypsin mit Hühnereiklar beobachtet, sich aber keinen Reim darauf machen können.

Inzwischen sind weitere temporäre Trypsininhibitoren gereinigt worden, wie man bei BURK et al. (38) und der Münchner Gruppe um TSCHESCHE (39, 40, 41) nachlesen kann. LASKOWSKI et al. postulierten in ihrer ersten Interpretation der temporären Hemmung einen TIT-Komplex (Trypsin-Inhibitor-Trypsin) (42). Sie stellten sich vor, daß das aktive Zentrum des ersten Trypsinmoleküls mit dem reaktiven Zentrum des Inhibitors reagiert, was inzwischen bestätigt werden konnte, während das zweite Trypsinmolekül an einer anderen Stelle außerhalb des reakti-

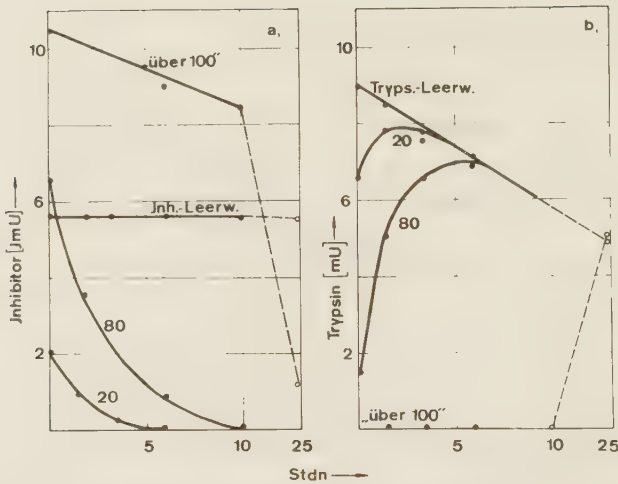


Abb. 10: Temporäre Hemmung; Abbau des Inhibitors aus Schweinepankreas durch Trypsin.

a) Inhibitoraktivität in ImU nach Enteiweißen der Ansätze mit Perchlorsäure. Ansätze je 1000 mU (0,1 mg) für Trypsin plus Inhibitor für 20 proz., 80 proz. und über 100 proz. Hemmung; plus 0,05 M Triäthanolaminpuffer 0,01 M CaCl_2 (pH 7,8) ad 10 ml. Inkubationstemperatur: 37°C . 0,1 ml der Ansätze wurden mit 6 %iger Perchlorsäure (1:1) enteiweißt und danach die Inhibitorkonzentration gemessen (Ordinate). Inh.-Leerw. = Inhibitor-Leerwert.

b) Von je 0,1 ml der Ansätze für Abb. a wurden gleichzeitig die Trypsinaktivitäten bestimmt. Tryps.-Leerw. = Trypsinleerwert.

von Zentrums des Inhibitors eine Spaltung verursachte (41). Die modifizierende Spaltung im Komplex hat im Gegensatz zu anderen tryptischen Spaltungen ein anderes pH-Optimum, nämlich 3 - 4. Bei diesem pH dissoziiert der Komplex signifikant. Die Dissoziation der Komplexe des Trypsins mit den modifizierten Inhibitoren ist dabei stärker als mit den nativen Inhibitoren.

Abbildung 11 zeigt Versuche, bei denen das Verhältnis zwischen Inhibitor und Trypsin konstant gehalten, aber das pH laufend

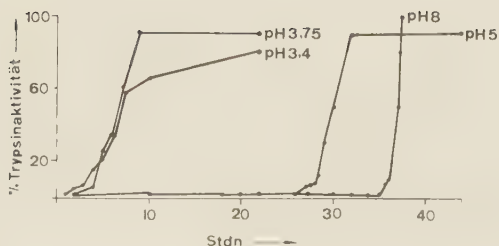


Abb. 11: Der Einfluß des pH auf das Wiedererscheinen der Trypsinaktivität. Schweinepankreasinhibitor (25 µg) wurde inkubiert mit Schweinetrypsin (76 µg) in 0,2 ml von 0,05 M Na-Citrat und 0,01 M CaCl₂ bei einem pH von 3,4; 3,75 und 5,0. 0,05 M Trispuffer, der 0,01 M CaCl₂ enthielt, wurde für pH 8 verwendet. Aliquote Teile von 10 µl wurden zu den verschiedenen Zeitpunkten entnommen und die tryptische Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse sind ausgedrückt in % der Trypsinkontrolle zur Nullzeit für jedes pH.

verändert wurde. Am raschesten wurde das Trypsin bei pH 3,4 wieder wirksam, am langsamsten bei pH 8.

Nach TSCHESCHE und KLEIN (41) treten bei 24stündiger Inkubation des Inhibitors mit 0,5 Mol Trypsin bei pH 3,75 nur kleine Peptide auf, während sie bei pH 8 einen beträchtlichen Anteil des unveränderten Inhibitors wieder erhielten.

LASKOWSKI inkubierte zweieinhalb Stunden Trypsin mit einem Überschuß an Inhibitor bei pH 3,4, bis etwa 20 % der tryptischen Aktivität reaktiviert waren. Dann wurde ein Teil des Ansatzes auf pH 8 eingestellt; die andere Portion wurde bei pH 3,4 belassen.

Es zeigte sich, daß bei pH 8,0 die gesamte Aktivität des Trypsins schneller zurückerhalten wurde als jene, die bei pH 3,4 inkubiert worden war. Dies bestätigt die These, daß die inaktivierende Spaltung nach der modifizierenden Spaltung beginnt und daß das Optimum für die inaktivierende Spaltung bei etwa

pH 8,0 liegt. Vermutlich hängt der Unterschied zwischen einem temporären und einem nicht temporären Inhibitor davon ab, was nach der modifizierenden Spaltung geschieht. Beim nicht temporären Inhibitor begünstigt die zweite Trypsinannäherung das reaktive Zentrum des Inhibitors so, daß sich der ursprüngliche Komplex bilden kann. Beim temporären Inhibitor bewirkt die zweite Trypsinannäherung eine Spaltung an einer Stelle außerhalb des reaktiven Zentrums des Inhibitors. Erst die zweite Spaltung inaktiviert.

Um die Ergebnisse, basierend auf den Messungen der Trypsinaktivität, zu erhärten, wurden die Reaktionen mit Hilfe von Gel-Elektrophoresen beobachtet. Abbildung 12 zeigt zeitlich genau festgelegt die erscheinenden Modifikationen des Inhibitors und beweist, daß der modifizierte Inhibitor viel eher erscheint als die Reaktivierung des Trypsins (siehe auch Abb. 11). Folglich sollten die Substanzen der einzelnen Modifikationen den aktiven Inhibitor darstellen. Wenn das Erscheinen der dritten Bande mit dem Wiedererscheinen der tryptischen Aktivität zusammenfällt, ist natürlich der Inhibitor in Bande 3 inaktiv. Daß der zweite Peak aktiv ist, wird durch einen Versuch erhärtet, bei dem eine katalytische Menge Trypsin (1 %) bei pH 3,4 verwendet wird. Die Reaktion wurde auf Gel-Elektrophorese-Platten ausgewertet und es zeigten sich nur zwei Banden, die dem intakten und dem modifizierten Inhibitor entsprachen.

Die physiologische Bedeutung der temporären Hemmung könnte darin zu sehen sein, daß das Trypsinogen des Pankreas - aus welchem Grund auch immer - bereits in der Drüse aktiviert werden kann, aber die Hemmung in Kraft tritt, bevor eine autokatalytische Aktivierung des Trypsins noch innerhalb des Gangsystems erfolgt und dort zu Gewebsveränderungen führt. Nach der Sekretion in das Duodenum wird jedoch das Trypsin wieder frei und für die Verdauung gebraucht, während der Inhibitor bereits abgebaut in den allgemeinen Eiweißmetabolismus eingeht.

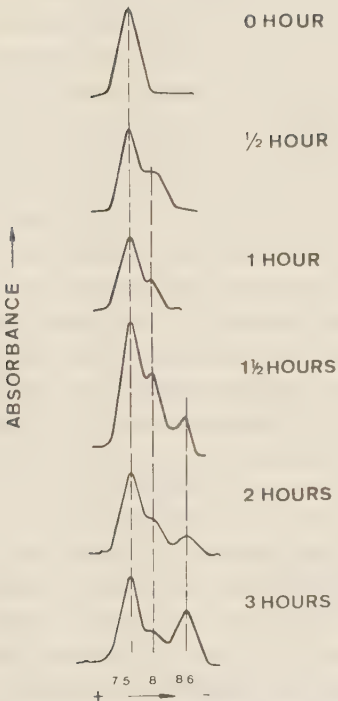


Abb. 12: Spektrophotometrische Messung bei 620 nm von Polyacrylamid-Gel-Eluaten; aliquote Teile von sekretorischem Schweinepankreasinhibitor und Trypsin bei pH 3,4. Inhibitor (2 mg) und Trypsin (5,6 mg) wurden in 1,2 ml von 0,05 M Na-Citrat-0,01 M CaCl_2 -Puffer pH 3,4 inkubiert. Alle 30 Min. werden 100 μl in 10 μl 6N HCl pipettiert; dazu werden 10 μl 25 %ige Trichloressigsäure gegeben. Vor der Elektrophorese werden die Proben zentrifugiert. Die Überstände werden über Polyacrylamid-Gel-Säulen von 0,25 x 10 cm gegeben, welche 12 % Acrylamid und 0,2 % N-N-Methylen-bis-acrylamid bei pH 3,5 enthielten. Glycinacetatpuffer pH 4 wurde für die Elektrophorese verwendet. Laufzeit 3,5 Stunden, 5 mA.

3. Sekretionsverhalten

Die trypsinspezifischen Inhibitoren weisen ein den Zymogenen analoges Sekretionsverhalten auf. Die nach Stimulierung der Pankreassekretion mit Sekretin und/oder Pankreozymin im Sekret nachweisbare Inhibitormenge ist imstande, jeweils etwa 2 - 5 % der in der gleichen Probe insgesamt aktivierbaren Trypsinmenge zu inhibieren. Beim Menschen werden z.T. auch wesentlich höhere Prozentwerte angegeben.

Methodik: Trypsinogen und der Trypsininhibitor wurden nach

bekannten Methoden bestimmt; Kallikrein wurde mit Hilfe von Trypsin aktiviert und die Wirkung des Kallikreins auf den Hundeblutdruck mit der von Standardkallikrein verglichen. Um eine gleichzeitige Bradykininfreisetzung durch Trypsin auszuschalten, wurden die Kallikrein-haltigen Proben vor der Injektion mit einem Überschuß an Sojabohneninhibitor versetzt (43). In den Vergleichswerten wurde die Kallikreinaktivität durch kurzes Erhitzen auf 100° C ausgeschaltet.

Der Bauchspeichel wurde, wie schon oben erwähnt, über einen operativ in den ductus pancreaticus eingeführten Kunststoffschlauch in eisgekühlte Vorlagen abgeleitet. Nach Abklingen des auf den jeweiligen Sekretionsreiz folgenden Sekretflusses wurde die Vorlage gewechselt. Die Stimulierung der Pankreassekretion erfolgte beim Menschen durch intravenöse Gaben von Sekretin und Pankreozymin (bis zu 1 E/kg Körpergewicht) und intra-duodenale Gaben von Trockengalle (44) nach dem in Abbildung 3 angegebenen Schema (17). Beim Hund erfolgte die Stimulierung sowohl durch intravenöse als auch durch intraarterielle (Pankreasarterie) Injektion von wechselnden Mengen Sekretin und Pankreozymin (vgl. Abb. 2). Aus den Abbildungen 2 und 3 geht hervor, daß die Sekretion des Inhibitors und des Präkallikreins (Kallikreinogen) parallel zu der des Trypsinogens erfolgt. Der Inhibitor und das Kallikreinogen dürften deshalb zusammen mit den anderen Zymogenen in den Zymogengranula gespeichert werden: sie stellen also reine Sekretproteine dar. Da die Aktivierung des Kallikreinogens erst im Duodenum erfolgt, ist die Funktion des Pankreaskallikreins wahrscheinlich im Bereich des Darmsystems zu suchen. Nach einer kürzlich erschienenen japanischen Arbeit wird Kallikrein von der Darmschleimhaut resorbiert und in der Durchströmungsflüssigkeit des Darmes nachweisbar (45).

Eventuell bewirken durch das resorbierte Kallikrein aus Kininogen freigesetzte Kinine eine Hyperämisierung und Motilitätssteigerung des Darms. Bei einer großen Zahl (ca. 25) von Versuchen fanden wir Konzentrationen von 5 - 80 (maximal bis 250

bei einzelnen Reizen) pro ml Sekret nach Aktivierung des Kalikreinogens (43), was einer sehr hohen Kapazität an freisetzbarem Kinin entspricht. Die im Sekret vorhandene Inhibitormenge vermag beim Hund durchschnittlich 0,5 - 3 % (Schwankungsfaktor: 6) des Trypsinogens nach dessen Aktivierung zu hemmen; bei sehr niedrigen Trypsinogenkonzentrationen (unter 1 mg pro ml Sekret) in einzelnen Fällen bis zu 5 %. Beim Menschen wurden nicht höhere Werte gefunden. Der Schwankungsfaktor lag bei 15 von 20 Sekretionsversuchen unter 3, maximal bei 6. Dies stimmt mit früheren Befunden von FRITZ et al. (46, 13, 16) sowie mit den von GREENE und Mitarbeitern (47) beim Rinderpankreas gefundenen Werten sehr gut überein. Im menschlichen Pankreassekret ist dieses Verhältnis also zu Gunsten des Inhibitors verschoben, so daß 4 - 10 % des Trypsinogens nach Aktivierung hemmbar sind. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Angaben von HAVERBECK und Mitarbeitern (25), die im menschlichen Pankreassekret eine Inhibitormenge fanden, die durchschnittlich 1/3 des vorhandenen Trypsinogens nach dessen Aktivierung zu hemmen vermochte. Die von KELLER und ALLAN (48) gemessene InhibitorKonzentration im menschlichen Pankreassaft (ca. 80 mU/ml) stimmt mit unseren Werten relativ gut überein.

Wir schlagen vor, bei Sekretionsstudien die ausgeschiedene Inhibitormenge auf die in den Proben vorhandene Trypsinogenmenge zu beziehen, da das Trypsin im Gegensatz zu allen anderen Enzymen des Pankreassaftes mit Hilfe des Substrates N-Benzoyl-arginin-p-nitroanilid sehr genau bestimmbar ist. Die heute noch weitgehend üblichen Bestimmungsmethoden für die Trypsinaktivität mit Estersubstraten oder Eiweißen (Casein, Hämoglobin) ist in Körperflüssigkeiten mit hohem Proteingehalt sowohl wegen der geringen Spezifität dieser Methoden als auch wegen der Störanfälligkeit beim optischen Test im UV-Bereich (hohe Eigenabsorption der Proben) zu ungenau. Um mögliche Fehlerquellen auszuschließen, wurden deshalb alle Inhibitorbestimmungen mit enteiweißten Sekretproben durchgeführt (12).

V. Halbwertszeiten von Sekretin und Pankreocym

1. Sekretin

Sekretin, ein Polypeptidhormon der Dünndarm-Mukosa, stimuliert die Saft- und Bicarbonatsekretion des exogenen Pankreas. Für experimentelle und diagnostische Zwecke wird Sekretin aus Hunde- und Schweinedarmextrakten isoliert; die Synthese des Sekretins ist gelungen. Die Aktivitäten der reinen Sekretinpräparate aus Darmextrakten und des synthetischen Sekretins sind identisch.

Als biologische Halbwertszeit wird die Zeitspanne definiert, in der der Blutspiegel eines Stoffes auf die Hälfte absinkt. Da die Messung der Sekretinkonzentration im Serum noch nicht möglich ist, kann nur indirekt über den Parameter Saftfluß auf die Aktivität von Sekretin im Serum geschlossen werden. Unsere Definition lautet: Die indirekte Sekretin-Halbwertszeit entspricht der Zeitspanne, in der die Aktivität des Sekretins, gemessen am Parameter der Pankreassekretion und transformiert über die Dosis-Wirkungs-Kurve, um die Hälfte abnimmt.

Nach intravenöser oder intraarterieller Injektion einer definierten Sekretinmenge steigt die Sekretionsrate nach kurzer Latenzzeit steil an und erreicht nach wenigen Minuten ein Maximum, dessen Höhe und Dauer durch die injizierte Sekretinmenge bestimmt ist. Erhöht man die injizierte Sekretinmenge, so nimmt die Höhe und Dauer des Sekretionsmaximums zu. Der nachfolgende Sekretionsabfall beschreibt eine Kurve erster Ordnung. Die Gesamtdauer der Sekretion ist länger, das sezernierte Saftvolumen höher (Abb. 13). Im mittleren Dosisbereich fallen die Saftverlaufskurven bei logarithmischem Maßstab parallel zueinander ab. Bei hohen Sekretindosen dagegen wird der Zahlenwert des Geschwindigkeitskoeffizienten der logarithmi-

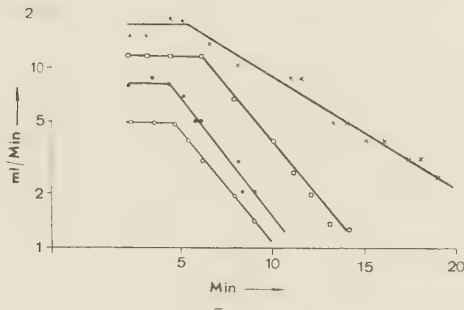


Abb. 13: Sekretionsverhalten nach verschieden hoch dosierten intravenösen Sekretininjektionen am Beispiel eines Hundes. Der Saftfluß wurde im logarithmischen Maßstab dargestellt (49).

schen Abfallsgeraden zunehmend kleiner. Mathematisch kann der Abfall der Saftverlaufskurven durch folgende Formel definiert werden:

$$\text{Saftfluß } y = y_0 \cdot e^{-kt} \quad (\text{in Abhängigkeit von der Zeit})$$

y_0 = Saftvolumen bei der Zeit $t = 0$; e = Basis des natürlichen Logarithmensystems; k = Geschwindigkeitskoeffizient; t = Zeit.

Die Sekretmenge, die nach Gabe einer definierten Sekretinmenge ausgeschieden wird, ist proportional dem Logarithmus der injizierten Sekretindosis (Abb. 14). Nach Injektion verschiedener Sekretinmengen wurde jeweils das gesamte Sekretvolumen bestimmt und die Sekretionsdauer registriert. Da Hunde als carnivoren im Gegensatz zum Menschen keine Basalsekretion zeigen, kann das Ende der Sekretion exakt ermittelt werden. Die Sekretionsdauer ist von der Dosishöhe abhängig. Um die Sekretvolumina nach verschiedenen Injektionen miteinander vergleichen zu können, muß eine einheitliche Sekretionsdauer festgestellt werden. Damit die Differenz zwischen der gewählten und der wirklichen Sekretionszeit möglichst gering ist,

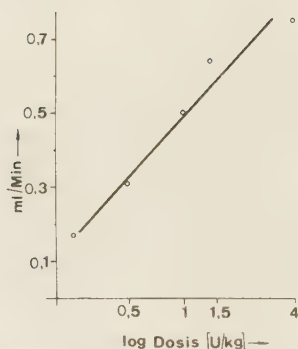


Abb. 14: Dosiswirkungskurve am Beispiel des gleichen Tieres wie Abb. 13. Sekretionsvolumen bezogen auf t_m und umgerechnet auf ml/min.

wird die mittlere Sekretionszeit als Mittelwert der Sekretionszeiten nach den injizierten Dosen D_1 bis D_n errechnet.

$$\text{Mittlere Sekretionszeit } t_m = \frac{t_{D1} + t_{D2} + \dots + t_{Dn}}{n} \text{ (min)}$$

In der Zeit t_m (min) wird das Sekretvolumen nach Injektion der einzelnen Sekretindosen gemessen und durch t_m dividiert. Die so erhaltenen Sekretvolumina pro Minute werden in Form einer Dosiswirkungskurve aufgetragen (Abb. 14). Sie besitzen jetzt die gleiche Dimension wie die Werte der Saftverlaufs-kurve (ml/min).

Da unsere Dosiswirkungskurve von Sekretin einer logarithmischen Funktion entspricht, überrascht es nicht, daß der durch Sekretin stimulierte Daftfluß ebenfalls einer solchen Funktion folgt. Schon LIN und IVY (50) fanden bei ihren Sekretionsstudien am exokrinen Hundepankreas einen ähnlichen Sekretionsverlauf, ohne ihn allerdings näher zu bewerten. Das gleiche

gilt auch für die von DREILING beim Menschen gefundenen Sekretionsverlaufskurven (51).

Solange Sekretin im Serum nicht direkt bestimmt werden kann, bleibt die Frage offen, nach welcher Funktion die Konzentration von Sekretin im Serum abnimmt. Die Aussagekraft der hier beschriebenen indirekten Bestimmungsmethode ist dadurch ausreichend, daß sie das Sekretionsverhalten der Drüse berücksichtigt. Sie kann jedoch eine Bestimmung der Serum-Elimination des Sekretins nicht ersetzen.

2. Pankreocymin

Auch die Konzentration von Pankreocymin (PC) ist im Serum noch nicht meßbar. Die Halbwertszeit von PC kann demnach in folgender Weise definiert werden:

Die indirekte Halbwertszeit von PC entspricht der Zeitspanne, in der die ekbolische Aktivität des Hormons, gemessen am Parameter der Enzymsekretion und transformiert über die Dosis-Wirkungs-Beziehung, um die Hälfte abnimmt.

Als Parameter für die ekbolische Aktivität wurde die Enzymsekretionsrate herangezogen. Die Enzymkonzentrationen schienen dafür weniger geeignet, da sie von der Höhe der Saft rate abhängig sind.

Unter Sekretin-Dauerinfusion mit Hilfe einer Lymphographiepumpe steigen nach PC-Injektion Enzymkonzentration, Volumen und Enzymmenge über ihr sekretininduziertes Niveau an und erreichen in den ersten Minuten ihr Maximum. Nach dem Durchlaufen eines Wendepunktes fallen diese Größen nach einer Exponentialfunktion erster Ordnung ab. Bei der von uns verwandten mittleren Dosierung (0,25 - 1,0 E PC/kg bzw. 2,0 E PC/kg) wurden nach den injizierten Dosen in den meisten Fällen Verlaufskurven der Enzymsekretion mit gleichem Geschwindigkeitskoeffi-

zienten erhalten. Deshalb erscheinen die Verlaufskurven bei Darstellung der Enzymsekretionsrate im logarithmischen Maßstab als Parallelen (Abb. 15).

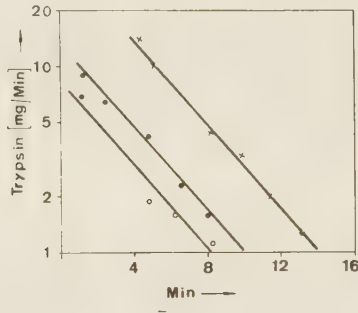


Abb. 15: Trypsinsekretion bei steigenden PC-Dosen unter Sekretininfusion. Die Ziffern an den Kurven geben die Dosen in E/kg an (52).

Die nach einer PC-Injektion ausgeschiedene Enzymmenge ist proportional dem Logarithmus der injizierten PC-Dosis (Abb. 16). Um die Enzymmengen nach verschiedenen PC-Dosen miteinander vergleichen zu können, wurde eine einheitliche Sekretionsdauer festgesetzt. Nach verschiedenen PC-Injektionen wurde jeweils der Zeitpunkt bestimmt, zu dem die basale Enzymsekretion wieder erreicht wurde. Aus diesen Zeitwerten wurde ein Mittelwert, die mittlere Sekretionszeit t_m , berechnet (siehe oben). In der Zeit t_m wurden die nach den einzelnen Dosen ausgeschiedenen Enzymmengen gemessen und durch t_m dividiert. Die so erhaltenen mittleren Enzym-Sekretionsraten besitzen die Dimension mg/min. auf der Ordinate (52).

Der Mittelwert aus den Halbwertszeiten $T_{\text{halb D1}}$ bis $T_{\text{halb D3}}$ usw. ergibt die mittlere Halbwertszeit $T_{\text{halb Dm}}$. Die Durchschnittswerte erbringen für $T_{\text{halb D1}} = 2,5 \text{ Min.}$, $T_{\text{halb D2}}$

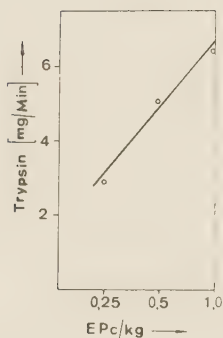


Abb. 16: Dosiswirkungskurve von PC am Hund.

Die Trypsinmengen sind bezogen auf t_m und umgerechnet auf mg/min.

= 1,6 Min., $T_{\text{halb D3}} = 1,2$ Min. und für $T_{\text{halb Dm}} = 1,8$ Min. Demnach ist die Halbwertszeit von PC kürzer als die von Sekretin. Hier beträgt sie 1,8 Min., dort betrug sie für $T_{\text{halb Dm}}$ 3,2 Min. Dieser Effekt kann über viele Stunden reproduziert werden. Am selben Tier beträgt der Variationskoeffizient 12,7 %. Die individuelle Schwankungsbreite der Enzymsekretion nach PC-Gabe variiert dagegen von Tier zu Tier auffällig. PC kann in fraktionierter Dosierung und auch als Infusion appliziert werden. Es gibt keine Refraktärperiode nach hormonaler Stimulierung (52). Die Enzymantwort des Pankreas nach fraktionierter Dosierung entspricht den Werten nach einmaliger Injektion der Gesamtdosis. Man kann deshalb die Enzymsekretion als Parameter für die zum jeweiligen Zeitpunkt noch vorhandene Aktivität von PC verwenden. Die Abnahme der Enzymkonzentration nach PC-Gabe folgt einer Funktion erster Ordnung. Da die durch PC induzierte Sekretionsrate ebenfalls nach einer Exponentialfunktion abfällt und statt $\log(s) + \log(c)$ auch $\log(s \times c)$ geschrieben werden kann (s = Volumensekretionsrate, c = Enzymkonzentration), ergibt sich auch für die Abnahme der Enzymsekretionsrate eine Funktion erster Ordnung. HARPER (53) fand eine entsprechende Funktion

für die Abnahme der Amylasekonzentration nach PC-Gabe bei der Katze, ohne auf dieses Phänomen näher einzugehen. Auch hier ist es so, daß noch kein spezifischer chemischer Nachweis von PC im Serum möglich ist. Die Aktivität nimmt nach einer Reaktion zweiter Ordnung ab. Reaktionen dieser Ordnung bilden im Bereich der Pharmakokinetik eine Ausnahme (54). Die Halbwertszeit von Sekretin liegt nach unseren Untersuchungen in einer ähnlichen Größenordnung (49). Die für Sekretin errechnete mittlere Halbwertszeit ist mit 3,2 Minuten größer als die von Pankreocymin (1,8 Min.), eine Voraussetzung für den ungestörten Sekretionsablauf der Drüse (länger anhaltende hydrokinetische Funktion gegenüber der ekbolischen Wirksamkeit). Ein Vergleich der zeitlichen Abläufe der Saftsekretion gibt möglicherweise einen Hinweis auf einen ähnlichen Wirkungs- und Eliminationsmechanismus der beiden Hormone.

Schluß und Zusammenfassung

Indem wir verschiedene stimulierende Substanzen direkt an ihren Wirkungsort i.a. applizierten, wurde es uns möglich, die Tätigkeit einer Drüse zu beobachten sowie bestimmte sezernierte Stoffe quantitativ zu isolieren und biochemisch zu untersuchen. Ausgehend von den Ergebnissen machten wir uns Gedanken über die physiologische Funktion der sekretorischen Proteinaseinhibitoren.

1. Anatomische Untersuchungen

Durch eingehende anatomische Studien und die Weiterentwicklung der operativen Methoden gelang es, Substanzen direkt ins Pankreas und in die Kopfspeicheldrüsen, d.h. in die die Drüsen versorgenden Arterien zu verabreichen und damit zu verhindern, daß diese Stoffe vor ihrer Wirkung in den Drüsen dem allgemeinen Verteilungsmechanismus im Körper ausgesetzt wurden. Dies schloß auch aus, daß die verwendeten Hormone Sekretin und Pankreocymin zum Teil im Blut bzw. in der Leber oder

in den Nieren verstoffwechselt wurden. So kamen wir zu einer exakten Dosierungsmöglichkeit und konnten verschiedene neue Erkenntnisse über Wirkung und Wirkungsverlauf von Sekretin und Pankreocymin erhalten. Daraus ließen sich Dosiswirkungskurven und Halbwertszeiten berechnen: für Sekretin beträgt die Halbwertszeit (T_{halb}) 3,2 Minuten; für Pankreocymin ist die Halbwertszeit 1,8 Minuten. Beide Ergebnisse sind die Durchschnittswerte ($T_{\text{halb } \bar{m}}$) nach Verabreichung verschiedener Mengen an Sekretin bzw. Pankreocymin.

2. Darstellung und Reinigung der sekretorischen Proteinaseinhibitoren

Durch Gabe von Sekretin und Pankreocymin in das Pankreas von verschiedenen Spezies konnten wir größere Mengen von Proteinaseinhibitoren gewinnen, isolieren und reinigen. Die einzelnen Inhibitoren konnten identifiziert und manche chemische Besonderheiten wie Komplexbildung und temporäre Hemmung beobachtet und gedeutet werden. Es hat sich herausgestellt, daß die Kopfspeicheldrüsen nicht über Hormone, sondern z.B. durch Parasympathicomimetika angeregt werden müssen. Sie zeigen deshalb auch ein anderes Sekretionsverhalten wie die Bauchspeicheldrüse. Da aber auch hier Proteinaseinhibitoren auftauchen, sollte die Physiologie und physiologische Chemie des oberen Verdauungstraktes mit den von uns entwickelten Methoden weiter untersucht werden.

3. Deutung der Ergebnisse

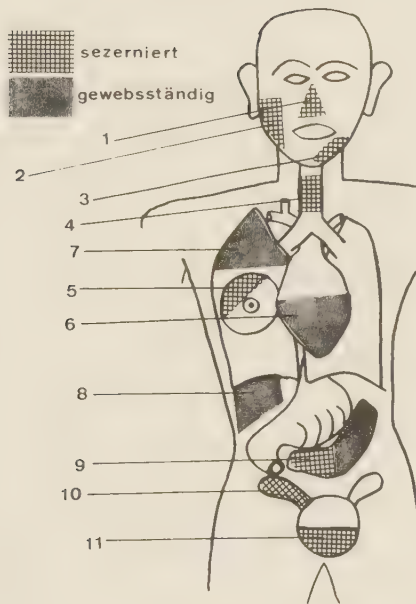
Die Funktion der von uns untersuchten sekretorischen Trypsin-inhibitoren und der Proteinaseinhibitoren kann z. Zt. nur durch indirekte Methoden erforscht werden. Unsere Ergebnisse führten uns zu folgender Hypothese:

Der menschliche und tierische Organismus hat u.a. die wichtige Aufgabe, seine Überkleidungen, d.h. Epithelien, vor Zer-

störung zu schützen. Dies geschieht im Verdauungstrakt durch mukösen Schleim und eine fein abgestufte Skala von sauren und alkalischen Milieus, die "ökologische Nischen" für verschiedene Wirkstoffe bilden. Im Dünndarm z.B. sollen die Proteinase in ihrem alkalischen pH-Optimum maximal wirken. Hier werden die Inhibitoren nicht benötigt und es wird dafür gesorgt, daß sie - obwohl vorhanden - in jedem Fall unwirksam bleiben 1. durch den enormen Überschuß von Trypsin und 2. durch den besonderen Mechanismus der temporären Hemmung. An den Bildungsstätten der Inhibitoren jedoch, wo auch die Vorstufen der stark wirkenden Proteinase wie z.B. des Trypsinogens des Pankreas entstehen und gespeichert werden, schützt die Drüse ihr Parenchym und Gangsystem auf dreierlei Weise:

- a. Sie läßt ihre Zellen meist nur die Vorstufen (Zymogene) der Enzyme anabolisieren.
- b. Sie geht mit dem pH ihrer Acinuszellen in den leicht sauren Bereich, um nicht sofort das Optimum zu bieten, falls ein Teil des gespeicherten Enzyms aktiv werden sollte.
- c. Die im Verhältnis zu den Zymogenen geringen Inhibitormengen stellen trotzdem für die Drüse sozusagen ein kleines Neutralisationspotential für den Notfall dar. So können, aus welchem Grund auch immer, innerhalb des Gangsystems freigewordene Proteinase inaktiviert werden, denn hier fehlt der im Darm vorhandene muköse Schutzüberzug."

Inwieweit therapeutisch einmal gegen Entgleisungen, d.h. plötzliches Freiwerden solcher Enzyme eingeschritten werden kann, ist noch unklar. Bisher wissen wir nur, daß z.B. die in-vitro-Autolyse beim menschlichen Pankreas durch Trypsin-inhibitoren nur verzögert, aber nicht unterbunden werden kann (55).



LITERATUR ZUM VORKOMMEN DER PROTEINASEN-INHIBITOREN IM KÖRPER
(siehe obenstehendes Schema)

1. HOCHSTRASSER, K.; H. HAENDLE; R. REICHERT; E. WERLE:
Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem. 325 (1971) 954 - 958
2. FREY, E.K.; H.K. KRAUT; E. WERLE:
in: Kallikrein
Stuttgart: Enke
3. TRAUTSCHOLD, I.; E. WERLE; H. HAENDLE; H. SEBENING:
Z.Physiol.Chem. 332 (1963) 328
4. HOCHSTRASSER, K.; R. REICHERT; S. SCHWARZ; E. WERLE:
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 353 (1972) 221 - 226
5. VOGEL, R.; I. TRAUTSCHOLD; E. WERLE:
Natürliche Proteinaseinhibitoren.
Stuttgart: Thieme 1966

6. KARLSON, P.:
Biochemie.
Stuttgart: Thieme
7. ASTRUP, T.:
18. Int.Physiol.Congr., Copenhagen 1950, Abstract p. 81
8. KAZAL, A.; D.S. SPICER; R.A. BRAHINSKY:
J.Amer.Chem.Soc. 70 (1948) 3034
- KUNITZ, M.; I.H. NORTHROP:
J.Gen.Physiol. 19 (1936) 991
9. FRITZ, H.; M. HUTZEL; E. WERLE:
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 348 (1967) 950
10. und 11. ASTRUP, T.; O.K. ALBRECHTSEN:
Scand.J.clin.Lab.Invest. 9 (1957) 233

LITERATURVERZEICHNIS

1. WEINLAND, E.:
Z.Biol. 44 (1903) 1
2. MENDEL, L.B.; A.F. BLOOD:
J.Biol.Chem. 8 (1910) 177
3. KUNITZ, M.; J.H. NORTHROP:
J.Gen.Physiol. 19 (1936) 991
4. COLLIER, H.B.:
Canad.J.Res. 19 B (1941) 90
5. GREEN, N.N.:
Biochem.J. 66 (1957) 416
6. PEANASKY, R.J.; M. LASKOWSKY:
J.Biol.Chem. 204 (1953) 153
7. KRAUT, H.; E.K. FREY; E. WERLE:
Z.Physiol.Chem. 192 (1936) 1
8. VOGEL, R.; I. TRAUTSCHOLD; E. WERLE:
Natürliche Proteinaseinhibitoren.
Stuttgart: Thieme 1966
9. LASKOWSKY jr., M.; R.W. SEALOCK:
in: BOYER, P.D.
The Enzymes Bd. III, 3. Aufl.
New York: Academic Press 1971, p. 375 - 473
10. WERLE, E.:
Z.Physiol.Chem. 338 (1964) 228
11. KAZAL, L.A.; D.S. SPICER; R.A. BRAHINSKY:
J.Amer.Chem.Soc. 70 (1948) 3034
12. GROSSMAN, M.I.:
Proc.Soc.exp.Biol.Med. 99 (1958) 304
13. FRITZ, H.; G. HARTWIG; E. WERLE:
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 345 (1966) 150 - 167
14. FRITZ, H.; H. SCHULT; M. HUTZEL; M. WIEDEMANN; E. WERLE:
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 348 (1967) 308 - 312
15. WERLE, E.; I. TRAUTSCHOLD; H. HAENDLE; H. FRITZ:
Ann.New York Acad.Sci. 146/2 (1968) 464 - 478
16. FRITZ, H.; I. HÜLLER; M. WIEDEMANN; E. WERLE:
Hoppe-Seyler's z.Physiol.Chem. 348 (1967) 405 - 418

17. FRITZ, H.; M. HUTZEL; I. HÜLLER; M. WIEDEMANN;
H. STAHLHEBER; P. LEHNERT; M.M. FORELL:
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 348 (1967) 1575 - 1578
18. HAVERBACK, B.J.:
JAMA 193 (1965) 279
19. HANSKY, I.; D.M. TISCORNIA; D.A. DREILING; H.D. JANOWITZ:
Amer.J.Physiol. 206 (1964) 351
20. SILMAN, I.H.; E. KATCHALSKI:
Ann.Rev.Biochem. 35 (1966) 873
21. LEVIN, Y.; M. PECHT; L. GOLDSTEIN; E. KATCHALSKI:
Biochem. 3 (1964) 1905
22. FRITZ, H.; K. HOCHSTRASSER; E. WERLE:
Z.anal.Chem. 243 (1968) 452
23. BIETH, I.; P. METAIS; J. WARTER:
Ann.Biol.Clin. 24 (1966) 787
24. ERLANGER, B.F.; N. KOKOWSKY:
Arch.Biochem.Biophys. 95 (1961) 271
25. HAVERBACK, B.I.; B. DYCE; H. BUNDY; H.A. EDMONDSON:
Ann.J.Med. 29 (1960) 424
26. NAGEL, W.; F. WILLIG; W. PESCHKE; F.H. SCHMIDT:
Z.Physiol.Chem. 340 (1965) 1
27. TRAUTSCHOLD, I.:
München: Habil.-Schrift 1965
28. TUPPY, H.; U. WIESBAUER; E. WINTERSBERGER:
Z.Physiol.Chem. 329 (1962) 287
29. FRITZ, H.; I. TRAUTSCHOLD; H. HAENDLE; E. WERLE:
Conf. New York Academy of Sciences, New York City
Sept. 12th - 13th, 1966
Ann.New York Acad.Sci. 146 (1968) 400
30. FRITZ, H.:
München: Habil.-Schrift 1968
31. Enzyme Nomenclature, Recommendations 1964, of the Inter-
national Union of Biochemistry, Elsevier Publ.Comp.,
Amsterdam 1965
(identisch mit: FLORKIN, M.; E.H. STOTZ:
Comprehensive Biochemistry 13, 2. Aufl.)
32. TRAUTSCHOLD, I.; E. WERLE:
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 325 (1961) 48

33. GREENE, L.H.; M.H. PUBOLS:
Proc.Int.Res.Conf. on Proteinase Inhibitors, Munich 1970,
Ed.: FRITZ, H.; H. TSCHESCHE
Berlin, New York: de Gruyter 1970, p. 66
34. KRESS, L.F.; S.R. MARTIN; M. LASKOWSKY sen.:
Biochem.Biophys.Act. 229 (1971) 836
35. LASKOWSKY, M. sen.; S.L. SCHNEIDER; K.A. WILSON; L.F. KRESS;
J.H. MOZEJKO; S.R. MARTIN; U. KUZICH; M. ANDREWS:
Proc.Int.Res.Conf. on Proteinase Inhibitors, Munich 1970
Ed.: FRITZ, H.; H. TSCHESCHE
Berlin, New York: de Gruyter 1970, p. 196
36. GORINI, L.; L. AUDRAIN:
Biochim.Biophys.Act. 8 (1952) 702
37. GORINI, L.; L. AUDRAIN:
Biochim.Biophys.Act. 10 (1953) 570
38. BURCK, P.J.; R.L. HAMILI; E.W. CERWINSKY; E.L. GRINNAN:
Biochemistry 6 (1967) 3180
39. TSCHESCHE, H.; E. WACHTER; S. KUPFER; K. NIEDERMEIER:
Z.Physiol.Chem. 250 (1969) 1247
40. TSCHESCHE, H.; E. WACHTER; G. KALLUP:
Z.Physiol.Chem. 350 (1969) 1662
41. TSCHESCHE, H.; H. KLEIN:
Z.Physiol.Chem. 349 (1968) 1645
42. LASKOWSKY, M. sen.; F.C. WU:
J.Biol.Chem. 204 (1953) 797
43. FRITZ, H.; I. ECKERT; E. WERLE:
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 348 (1967) 1120
44. FORELL, M.M.; H. STAHLHEBER:
Klin.Wschr. 44 (1966) 1184
45. MORIWAKI, Ch.; K. YAMAGUCHI; K. KIZUKI; H. FUJIMORI:
Kallikrein-physiol. properties and pharmacol. rational.
Symposion: Mainz, Germany, Nov. 17th - 19th, 1972
46. FRITZ, H.; F. WOITINAS; E. WERLE:
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 345 (1966) 168
47. GREENE, L.J.; M. RIGBI; D.S. FACKRE;
J.Biol.Chem. 241 (1966) 5610
48. KELLER, P.I.; B.I. ALLAN:
J.Biol.Chem. 242 (1967) 281

49. LEHNERT, P.; H. STAHLHEBER; M.M. FORELL; F.H. DOST;
H. FRITZ; M. HUTZEL; E. WERLE;
Klin.Wschr. 47 (1969) 1200 - 1204
50. LIN, T.M.; A.C. IVY;
Amer.J.Physiol. 189 (1957) 361
51. DREILING, D.A.; H.D. JANOWITZ; C.v. PERRIER:
Pancreatic Inflammatory Disease. A Physiologic Approach.
New York - Evanston - London: Hoeber Med.Div., Harper &
Row (1964)
52. LEHNERT, P.; H. STAHLHEBER; M.M. FORELL; F.H. DOST;
H. FRITZ; M. HUTZEL; E. WERLE;
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 351 (1970) 983 - 989
53. HARPER, A.A.:
in: Handbook of Physiology Sect. 6, Vol. II
Amer.Physiol.Soc. 1968
54. DOST, F.H.:
Grundlagen der Pharmakokinetik
Stuttgart: Thieme 1968
55. WERLE, E.; I. TRAUTSCHOLD; H. SEBENING; H. FRITZ; M. HUTZEL:
Verh.Dt.Ges.inn.Med., 70. Kongr. 1964, S. 801

LEBENS LAUF

Geboren: 14.5.1933 in Aldersbach
Vater: Hans Hutzel, Gutsverwalter
Mutter: Anna, geb. Liebl
1939 - 1944: Volksschule in Passau-Haidehof und Passau-Innstadt
1944 - 1951: Hum. Gymnasium Passau bis zur Mittleren Reife
1951 - 1953: Tätigkeit als Hilfsarbeiter im Hochbau, um die weitere Ausbildung zu finanzieren
1953 - 1955: Chemieschule Dr. Erhardt in München
Staatsexamen als Chemotechniker
1955 - 1972: Chem.techn.Ass. am Klinisch-Chemischen Institut unter der Leitung von Prof.Dr. Dr. E. Werle
Arbeiten über Proteinase und ihre Inhibitoren, Histamin und Antihistaminika;
Selbständige tierexperimentelle Operationsmethoden und biochemische Untersuchungen
1959: Eheschließung mit Dr. Anna Haarer, heute Fachärztin für Anästhesie
Kinder: 3 Töchter
1969: Begabtenabitur am Bayr. Kultusministerium München und Beginn des Medizin-Studiums in München
1971: Ärztliche Vorprüfung
1971 - 1973: Arbeiten zur vorliegenden Dissertation
1974: Med. Staatsexamen nach dem Sommersemester.

